

ROSÂNGELA ROGINSKI RÉA

**IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO DE
ANTICORPOS ANTIILHOTA PANCREÁTICA E SUA
APLICAÇÃO EM PACIENTES E IRMÃOS DE
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO I**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Mestrado de Medicina Interna, Setor de
Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Paraná.

CURITIBA

1996

ROSÂNGELA ROGINSKI RÉA

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTIILHOTA PANCREÁTICA E SUA APLICAÇÃO EM PACIENTES E IRMÃOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO I

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado, do Departamento de Clínica Médica, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Pasquini
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Sergio Atala Dib
Escola Paulista de Medicina

Curitiba, 19 de dezembro de 1996

ROSÂNGELA ROGINSKI RÉA

**IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS
ANTILHOTA PANCREÁTICA E SUA APLICAÇÃO EM PACIENTES
E IRMÃOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO I**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre. Mestrado de Medicina
Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini

**Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando
Bleggi Torres**

**CURITIBA
1996**

***Ao Álvaro,
por abrir e iluminar caminhos.***

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Edgard D'Ávila Niclewicz**, pela amizade e estímulo ao estudo do Diabetes Mellitus.

Aos demais Professores da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da UFPR, **Drs. Hans Graf, Henrique de Lacerda Suplicy e Luiz Antonio Hungria de Camargo**, pelo apoio e confiança durante o longo período de trabalho.

Ao **Prof. Dr. Jose Barbosa**, da Universidade de Minnesota, Minneapolis, que participou de maneira fundamental em cada fase do presente estudo.

Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres**, por sua contribuição na discussão dos problemas e na leitura paralela de todas as lâminas.

Ao **Dr. Ronaldo Moreno Carvalho**, cujo dinamismo na coordenação do Serviço de Captação de Órgãos para Transplantes, em Curitiba, tem possibilitado salvar vidas e estimular a atividade científica.

Ao **Profs. Drs. Júlio Cezar Uili Coelho e Júlio César Wiederkehr** pelo importante auxílio na obtenção dos pâncreas.

Ao **Prof. Paulo Afonso Bracarense Costa** pela análise estatística dos dados.

À técnica **Terezinha Iraci Zaborowski**, pela responsabilidade e dedicação na exaustiva repetição dos testes.

À Sra. **Izabel Cristina Guareschi**, pelo auxílio competente e prestativo na organização final do texto.

Aos meus pais **Eduardo** e **Edenir** e aos meus sogros **Mário** e **Regina**, que com seu amor sabem compensar meus filhos por minhas horas de ausência, tornando esta ausência menos difícil.

E aos meus filhos, **Ricardo** e **Sílvia**, com amor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	04
REVISÃO DA LITERATURA	06
1 EMBRIOLOGIA E HISTOLOGIA DAS ILHOTAS DE LANGERHANS	07
2 FISIOPATOLOGIA DO DIABETES TIPO I	10
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ANTICORPOS ANTILHOTA.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS	18
FASE I	19
1 Obtenção do tecido pancreático	19
2 Estabelecimento da curva padrão	20
3 O método	21
FASE II	23
1 Seleção dos grupo para estudo.....	23
2 Aferição dos valores de ICAs.....	23
METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	47
ANEXOS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ILHOTA DE LANGERHANS CORADA PELO HE.....	08
FIGURA 2 - ILHOTA DE LANGERHANS À IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ENOLASE	08
FIGURA 3 - HISTÓRIA HIPOTÉTICA PARA O DIABETES AUTO-IMUNE	10
FIGURA 4 - ILHOTA DE LANGERHANS POSITIVA À PESQUISA DE ICAs.....	26
FIGURA 5 - EXPRESSÃO REPRESENTATIVA DE DADOS, DE ACORDO COM A CURVA DE REFERÊNCIA PARA UNIDADES JDF.....	28
FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM RESULTADO POSITIVO, DE ACORDO COM A DILUIÇÃO DO SORO	31
FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES PESQUISADOS, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA E O RESULTADO DA LEITURA	32
FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES PESQUISADOS, SEGUNDO O SEXO E O RESULTADO DA LEITURA	33
FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES PESQUISADOS, SEGUNDO A OCORRÊNCIA OU NÃO DE CETOACIDOSE E O RESULTADO DA LEITURA	34
FIGURA 10 - PREVALÊNCIA DE ICAs NO DMID RECÉM-DIAGNOSTICADO	41
FIGURA 11 - OUTRA HISTÓRIA HIPOTÉTICA PARA O DIABETES AUTO-IMUNE	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SORO DA UNIVERSIDADE DE MINNESOTA, COM OS PÂNCREAS Nº 2 A 6.....	27
TABELA 2 - CONCORDÂNCIA DOS PÂNCREAS DE Nº 2 a 6, EM RELAÇÃO AOS SOROS DA UNIVERSIDADE DE MINNESOTA	27
TABELA 3 - TÍTULO FINAL PARA CADA DILUIÇÃO, A PARTIR DO SORO NÃO-DILUÍDO E DE DILUIÇÕES SUBSEQÜENTES	29
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES E IRMÃOS DOS PACIENTES PESQUISADOS, DE ACORDO COM A IDADE E O RESULTADO DA LEITURA	32
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES E IRMÃOS DOS PACIENTES PESQUISADOS, DE ACORDO COM O SEXO E O RESULTADO DA LEITURA	33
TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES E IRMÃOS DOS PACIENTES PESQUISADOS, DE ACORDO COM A OCORRÊNCIA OU NÃO DE CETOACIDOSE E O RESULTADO DA LEITURA	34
ANEXO 1 - DADOS DOS PACIENTES COM DIABETES TIPO I RECÉM-DIAGNOSTICADO	50
ANEXO 2 - DADOS DOS IRMÃOS DE PORTADORES DE DIABETES TIPO I	51

RESUMO

Desde a primeira descrição dos anticorpos citoplasmáticos contra células da ilhota (ICAs) em pacientes com diabetes tipo I, estes marcadores humorais vem sendo progressivamente mais utilizados em investigação clínica. No presente estudo, um método para detecção dos ICAs foi implantado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Os anticorpos foram determinados de acordo com um protocolo padrão, baseado na técnica convencional de imunofluorescência indireta, em cortes de pâncreas humano realizados em criostato. ICAs foram primeiramente pesquisados pesquisando-se 5 pâncreas diferentes e 10 amostras de soro. Através da comparação dos resultados com aqueles obtidos na Universidade de Minnesota, um dos pâncreas foi selecionado para ser usado na segunda parte do estudo. Uma curva padrão foi construída, baseada no título final de diluição obtido neste mesmo pâncreas para diferentes diluições do soro internacional de referência, possibilitando a expressão dos resultados em unidades JDF (*Juvenile Diabetes Foundation*). A prevalência dos ICAs foi então determinada em cinquenta crianças e jovens com diabetes tipo I recém-diagnosticado e em 40 irmãos não-afetados de pacientes com diabetes tipo I. A porcentagem encontrada de pacientes com ICAs na instalação do diabetes (66%) se encontra dentro da variação descrita por outros (50-84%). A frequência relativamente alta de ICAs no grupo de irmãos (5%) exige testes futuros em um número maior de pessoas, com acompanhamento rigoroso.

ABSTRACT

Since the first description of cytoplasmic islet cell antibodies (ICA) in type I diabetic patients, these humoral markers have been increasingly applied in clinical investigations. In this study, a method for ICA detection was established at the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal do Paraná. These antibodies were determined according to a standard protocol based on the conventional indirect immunofluorescence technique, on cryostat sections of human pancreas. ICA were first determined using 5 different pancreata and 10 serum samples. By comparison of results with those obtained at the University of Minnesota, one of the pancreas was selected to be used in the second part of the study. A standard curve was constructed based on end-point titers obtained on this very pancreas for different dilutions of the international reference serum, making it possible to express the results in JDF (*Juvenile Diabetes Foundation*) units. The prevalence of ICA was then studied in 50 newly diagnosed children and juveniles with type I diabetes, and in 40 unaffected siblings of type I diabetic patients. The percentage of patients with ICA at the onset of the disease (66%) was within the range reported by others (50-84%). The relatively high frequency of ICA in the group of siblings (5%) demands further testing in a greater number of persons, and close follow-up.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus insulino-dependente (DMID), também chamado diabetes tipo I, juvenil ou auto-imune, é uma doença metabólica resultante da destruição das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, sendo necessária reposição permanente de insulina para a manutenção das funções metabólicas do indivíduo. A progressão da doença é caracterizada por lesões vasculares ateroscleróticas, insuficiência renal e amaurose. Ao nos depararmos com uma enfermidade como esta, que freqüentemente se instala na infância e adolescência, determinante de um grande número de imposições na vida diária e associada a tão graves complicações, é impossível que não nos perguntemos: isto é mesmo inevitável?

A descoberta de anticorpos circulantes contra células das ilhotas de Langerhans (ICAs) no pâncreas e sua relação com a presença ou o futuro desenvolvimento de diabetes tipo I (BOTTAZZO, FLORIN-CHRISTENSEN e DONIACH, 1974; MACCUISH et al. 1974), favoreceu a implicação da auto-imunidade na fisiopatologia da doença e abriu uma nova perspectiva.

Estudos conduzidos posteriormente, utilizando terapêutica imunossupressora, não conseguiram de forma inequívoca modificar a evolução do DMID recém-diagnosticado (MAHON e DUPRE, 1996). As pesquisas então se voltaram para o que passou a ser denominada a fase não-hiperglicêmica do diabetes tipo I ou fase de pré-diabetes, pela crença de que a intervenção mais precoce poderia impedir a destruição progressiva das ilhotas até o desenvolvimento de sintomas clínicos da doença (REWERS e NORRIS, 1996).

As coortes selecionadas para estudo foram de familiares de portadores de DMID, cuja probabilidade um pouco maior de apresentar a doença em relação à população

geral deveria proporcionar uma maior frequência do desfecho a ser observado. O comportamento dos ICAs e de outros marcadores imunológicos foram sendo estudados, com o objetivo de analisar sua possibilidade de predizer a doença.

Atualmente ainda se busca um ou mais marcadores que sejam, de forma isolada ou conjunta, ao mesmo tempo sensíveis, específicos e de fácil execução, para a predição do diabetes tipo I, tanto em familiares de pacientes com diabetes tipo I como na população geral. Enquanto este marcador ideal não está disponível, já se encontram em andamento os primeiros estudos de intervenção em familiares de diabéticos, com base na presença de ICAs, na avaliação da secreção de insulina e na ausência de determinados marcadores genéticos (SKYLER e MARKS, 1996).

A implantação da técnica para detecção dos ICAs no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, traz a possibilidade de participação do Centro de Pesquisa em Diabetes em protocolos internacionais, além de tornar estes anticorpos disponíveis para uso clínico. A pesquisa de familiares positivos dentre um grupo de irmãos de pacientes com diabetes tipo I no presente trabalho, consiste na primeira etapa da identificação do potencial deste anticorpo como marcador da doença em nosso meio.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1** Revisar alguns aspectos da literatura relacionada à detecção dos anticorpos antiilhota, no sentido de justificar a escolha do método e posicionar este marcador no contexto da história natural do diabetes tipo I.
- 2** Implantar o método para detecção dos anticorpos antiilhota no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, através da pesquisa por imunofluorescência indireta em cortes de pâncreas humano não-fixado (fase I).
- 3** Observar a prevalência dos anticorpos antiilhota em um grupo de 50 pacientes com diabetes tipo I recém-diagnosticado e em 40 irmãos de pacientes com diabetes tipo I, aplicando a técnica recém-implantada (fase II).

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

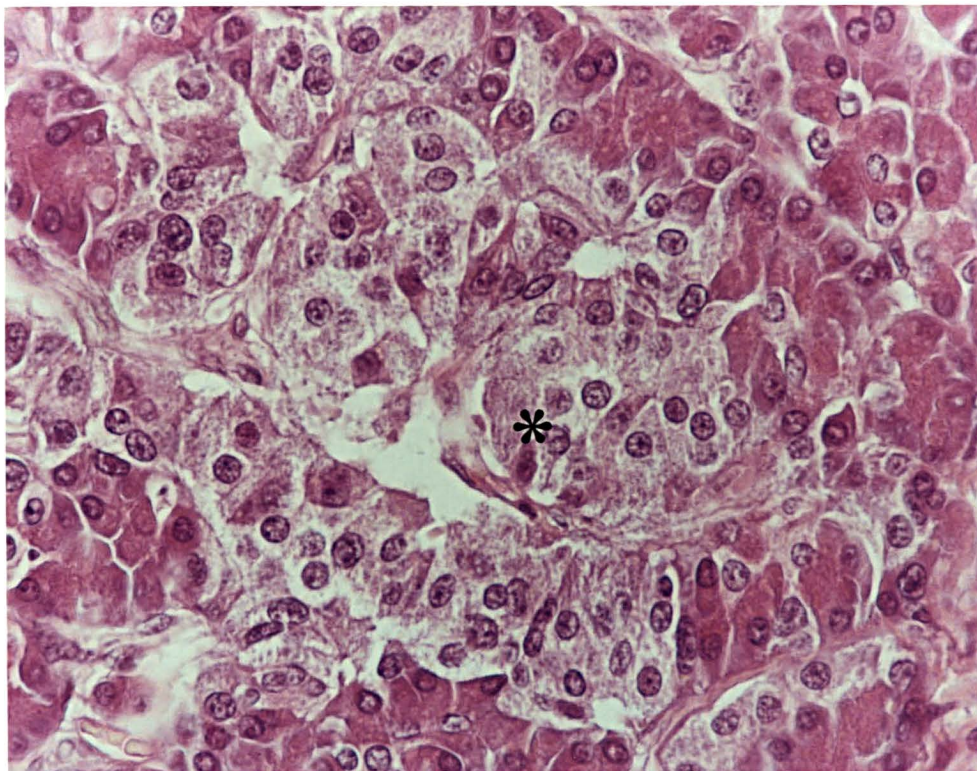
1 EMBRIOLOGIA E HISTOLOGIA DAS ILHOTAS DE LANGERHANS

O pâncreas é composto por dois tipos principais de tecidos: os ácinos, os quais secretam sucos digestivos no duodeno e as ilhotas de Langerhans, as quais não eliminam suas secreções externamente, porém, ao contrário, secretam insulina e glucagon diretamente na corrente sanguínea.

Um pâncreas humano contém mais de um milhão de ilhotas e cada ilhota consiste de vários milhares de células, em organização tridimensional (WILLIAMS e GOLDFINE, 1985; BONNER-WEIR e SMITH, 1994). As ilhotas de Langerhans parecem se originar de algumas células protodiferenciadas das porções terminais dos túbulos pancreáticos em formação. No início estas células estão espalhadas por todo o tecido exócrino, depois se distribuem em grupos na membrana basal e finalmente estes grupos serão separados do tecido exócrino para formar ilhotas (PIETROPAOLO e BABU, 1996).

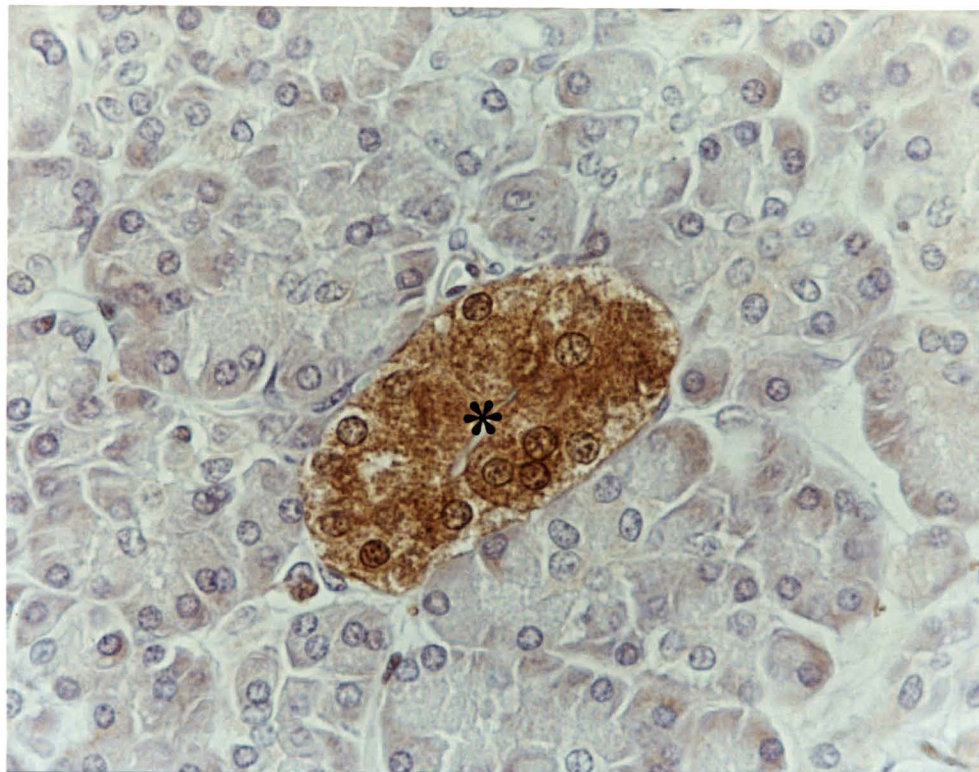
As ilhotas contêm três tipos principais de células que são denominadas alfa, beta e delta, as quais se diferenciam umas das outras por suas características morfológicas e de coloração. As células beta, que constituem aproximadamente 60 por cento de todas as células, localizam-se principalmente no meio das ilhotas e secretam insulina. As células alfa, aproximadamente 25 por cento do total, secretam glucagon. E as células delta, em torno de 10 por cento do total, secretam somatostatina. Além disso, pelo menos um outro tipo de célula, a célula PP, está presente em pequeno número nas ilhotas e secreta um hormônio denominado polipeptídeo pancreático (GUYTON e HALL, 1996).

FIGURA 1 - ILHOTA DE LANGERHANS CORADA PELO HE



Corte histológico de pâncreas humano, demonstrando ILHOTA DE LANGERHANS (*) composta por células com citoplasma mediano e granular e núcleos ovais (HE X 400).

FIGURA 2 - ILHOTA DE LANGERHANS À IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ENOLASE



Corte histológico de pâncreas humano, corado por imunohistoquímica para ENOLASE (*), demonstrando forte positividade de grânulos neurosecretórios no citoplasma das células (Avidina-Biotina /PAP X 400).

A distribuição de células endócrinas não é ao acaso, com um núcleo de células beta circundado por um manto descontínuo de células não-beta, com 1 a 3 células de espessura; ilhotas humanas podem ser consideradas como tendo várias destas subunidades.

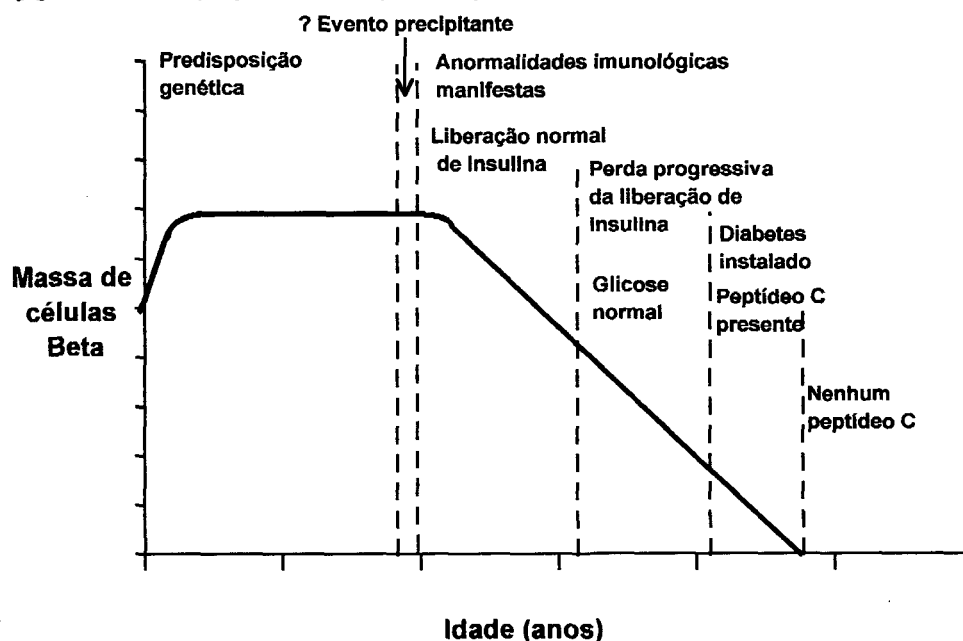
Células beta são poliédricas e arranjadas em tubos de 8 a 10 células circundando capilares (HUTTON, 1989). Em células beta bem granuladas o retículo endoplasmático rugoso é escasso e disperso entre numerosos grânulos secretórios. O grânulo secretório de insulina da célula beta pancreática mede 200-300 nm em diâmetro e é uma organela intracelular complexa composta de muitas proteínas, com diferentes funções fisiológicas e enzimáticas (PIETROPAOLO e BABU, 1996)

O crescimento do tecido da ilhota é superado pelo crescimento do tecido exócrino, de tal maneira que a massa de ilhotas de 20 % no recém-nascido compreende no adulto apenas 1 a 2% de todo o pâncreas, ou seja, 1 g do tecido com 8 mg ou 200 U de insulina (BONNER-WEIR e SMITH, 1994; PIETROPAOLO e BABU, 1996). O tamanho de uma ilhota pode variar desde umas poucas células e menos de 40 μm em diâmetro para aproximadamente 5000 células e 400 μm em diâmetro. Dentro do pâncreas, pequenas ilhotas de até 160 μm de diâmetro tendem a se distribuir por todo o tecido pancreático. No rato e provavelmente em outros mamíferos, ilhotas com até 160 μm representam 75% das ilhotas em número, mas somente 15% em volume. Ilhotas maiores que 250 μm em diâmetro são somente 15% em número, mas 60% do volume. Estas ilhotas são localizadas próximo a ductos maiores ou vasos sanguíneos que não são cercados por tecido acinar (WILLIAMS e GOLDFINE, 1985; BONNER-WEIR e SMITH, 1994). Além da diferença em tamanho das ilhotas, acredita-se que as ilhotas seriam heterogêneas em função (PIETROPAOLO e BABU, 1996; BONNER-WEIR e SMITH, 1994). A cauda, corpo e parte superior da cabeça é pobre em glucagon e rica em polipeptídeos pancreáticos, enquanto a maior parte da cabeça do pâncreas (processo uncinado) é rica em glucagon e pobre em polipeptídeos pancreáticos. A heterogeneidade das células da ilhota poderia explicar por que no diabetes mellitus tipo I as células não sofrem simultaneamente o mesmo processo patológico.

2 FISIOPATOLOGIA DO DIABETES TIPO I

Segundo o modelo proposto por EISENBARTH (1986), o desenvolvimento do diabetes tipo I se processaria em seis estádios, sendo o primeiro deles o da suscetibilidade genética. Algumas pessoas geneticamente suscetíveis teriam um evento hipotético (estádio II), o qual desencadearia a auto-imunidade (estádio III). Inicialmente, mesmo pacientes com anormalidades imunológicas evidentes teriam secreção de insulina normal. Durante o estágio IV, além das anormalidades imunológicas, observa-se perda progressiva da capacidade de secreção de insulina estimulada pela glicose, apesar do paciente ainda apresentar níveis glicêmicos normais. O fim da assim chamada fase de pré-diabetes ou fase não-hiperglicêmica do diabetes, corresponderia à instalação clínica da doença (estádio V), quando somente dez por cento de células beta ainda persistiriam, com alguma secreção residual de insulina. Alguns anos depois do desenvolvimento declarado do diabetes, essencialmente todas as células beta teriam sido destruídas (estádio VI) (Figura 3).

FIGURA 3 - HISTÓRIA HIPOTÉTICA PARA O DIABETES AUTO-IMUNE



FONTE: EISENBARTH, GS. 1986.

Desta forma, o diabetes tipo I poderia ser definido como uma doença auto-imune geneticamente programada. Doenças auto-imunes são doenças devidas a efeitos patogênicos de auto-anticorpos ou células T auto-reativas que provocam inflamação, alterações funcionais e lesões anatômicas. Quatro critérios geralmente têm sido utilizados para se considerar uma doença como auto-imune (ROSE e BONA, 1993):

1. o estado de doença pode ser transferido pelos anticorpos ou células T dos pacientes;
2. o curso da doença pode ser desacelerado ou evitado por terapêutica imunossupressora;
3. a doença está associada a manifestações de auto-imunidade humoral ou mediadas por célula e dirigida contra o órgão alvo;
4. a doença pode ser experimentalmente induzida por sensibilização contra um antígeno presente no órgão alvo, o que pressupõe o conhecimento do auto-antígeno alvo.

Os primeiro e segundo pontos seriam mandatórios e o terceiro e quarto importantes, porém menos críticos. O DMID humano preenche os três primeiros destes critérios e argumentos indiretos existem em modelos animais para o quarto (BACH, 1994).

Recentemente foi contestado este “dogma” de que o diabetes tipo I é uma doença auto-imune órgão-específica clássica, na qual células beta são destruídas por mecanismos mediados por linfócitos T e que auto-anticorpos circulantes são marcadores do processo de doença em andamento (NERUP et al., 1994). Segundo esta teoria, se o termo patogênese define os primeiros eventos e mecanismos envolvidos na destruição da célula beta, existem amplas evidências de que uma série distinta de acontecimentos têm lugar, muito antes que a invasão da ilhota e a destruição da célula beta por linfócitos T citotóxicos seja possível. Desta forma, a patogênese do DMID compreenderia duas fases. Em uma fase inicial, não linfócito-dependente, o macrófago teria um papel fundamental como apresentador do antígeno, acelerador da resposta imune e produtor de moléculas citotóxicas contra a célula beta, ou seja, secreção de

citocinas. A segunda fase corresponderia à amplificação e perpetuação da destruição da célula beta, mediada por linfócitos T. Ainda segundo este modelo as proteínas da ilhota não seriam antígenos em sua forma nativa; ao contrário, estas proteínas se tornariam antígenos após as células beta serem destruídas.

Com respeito à destruição da célula beta no contexto da inflamação, outra hipótese deve ainda ser considerada. Acredita-se atualmente que a apoptose ou morte programada é uma característica de um número de populações celulares. Considerando-se esta possibilidade, poderia haver um defeito genético nas células beta, levando-as à morte em uma taxa que superaria sua capacidade de regeneração. A morte celular levaria à liberação de constituintes intracelulares, induzindo à resposta inflamatória, que é observada como insulite. A inflamação meramente aumentaria o processo destrutivo. Apesar de ser uma hipótese atraente, segundo alguns autores um defeito intrínseco na célula beta seria improvável em humanos, em virtude da ausência de concordância absoluta da doença em gêmeos monozigóticos. Em modelos animais as evidências contra este mecanismo de autodestruição programada seriam ainda mais fortes. Ratos BB (*BioBreeding*, ratos que desenvolvem espontaneamente diabetes semelhante ao diabetes tipo I humano), tratados com transfusão inespecífica de linfócitos, têm o diabetes permanentemente evitado e, tanto em ratos BB como em camundongos NOD (camundongos diabéticos não-obesos, outro modelo animal do DMID humano) estudados por histologia seriada, não foram observadas evidências de apoptose de células beta (ROSSINI et al., 1993).

Por outro lado, evidências abundantes sugerem que o DMID resulta da destruição das células β da ilhota mediada por células. Estas evidências incluem a demonstração de respostas de células T específicas para antígenos das células β em pacientes com DMID e naqueles com risco aumentado para a doença, mais o infiltrado de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas. Além disso, foram descritas alterações nas linhagens de linfócitos (POZZILLI et al., 1983), diminuição na relação de linfócitos CD4/CD8 (AL-SAKKAF et al., 1989) e lise de células da ilhota mediada por linfócitos T citolíticos (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 1991).

Observações em modelos animais sugerem também que células T são necessárias e ativamente envolvidas na destruição das células beta. Estes dados tornam razoável lançar a hipótese de que marcadores específicos da imunidade celular deverão se tornar, oportunamente, superiores a auto-anticorpos na capacidade de prever a instalação da doença. Entretanto, a avaliação da reatividade da célula T, baseada somente na proliferação, é dificultada por vários fatores (ATKINSON e BOWMAN, 1996). A frequência antecessora de células T auto-reativas na periferia, na maior parte das doenças auto-imunes, parece ser baixa e a medida da proliferação não leva em conta que células T reguladoras podem estar modulando a atividade das células T a nível local, fazendo com que a proliferação possa não estar relacionada com o estado de propensão à doença. Infelizmente, estudos de grande porte monitorizando a produção de citocinas, bem como a frequência de células auto-reativas que antecedem a instalação clínica da doença em pessoas com diabetes, ou com risco aumentado para a doença, ainda não foram publicados.

Marcadores mais fiéis no DMID têm sido os anticorpos citoplasmáticos contra células da ilhota (ICAs) (BOTTAZZO, FLORIN-CHRISTENSEN e DONIACH, 1974), os anticorpos antiinsulina (IAA) (GORSUCH et al., 1981), anticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) (BAEKKESKOV et al., 1982) e mesmo anticorpos que seriam dirigidos a supostos componentes da reatividade dos ICAs, como os anticorpos anti-proteína tirosino-fosfatase (anti-PTP) (BONIFACIO et al., 1995).

ICAs são anticorpos órgão-específicos, reagindo contra todos os tipos de células da ilhota e, dentre os marcadores citados, são os mais estudados, reconhecidos e validados marcadores da fase não-hiperglicêmica do diabetes tipo I (BINGLEY et al., 1993). Outras indicações clínicas para os testes de detecção dos ICAs, além da predição do diabetes tipo I, são a averiguação do desenvolvimento de futura insulino-dependência em diabéticos tipo II tratados com dieta e hipoglicemiantes orais (NISKANEN et al., 1991) e em indivíduos com diabetes gestacional (MCEVOY, FRANKLIN e GINSBERG-FELLNER, 1991).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ANTICORPOS ANTIILHOTA

A descoberta dos ICAs veio fortalecer o conceito de que o diabetes tipo I é uma doença auto-imune. A partir da década de 70 começaram a se acumular evidências de auto-imunidade pancreática, porém uma das dificuldades para que fosse aceita a forma auto-imune do diabetes mellitus era justamente a ausência de anticorpos circulantes contra células da ilhota, nos estudos feitos até então. Finalmente em novembro de 1974 foi descrita a detecção de tais anticorpos por imunofluorescência, em 13 pacientes com doença poliglandular auto-imune, de um total de 171 casos estudados (BOTTAZZO, FLORIN-CHRISTENSEN e DONIACH, 1974). Os autores observaram que a falha nas tentativas prévias para detecção dos ICAs poderia ser atribuída ao teste de diabéticos não selecionados, excluindo-se em uma série de pacientes com outras desordens auto-imunes. E ressaltaram que todos os pacientes diabéticos tiveram a pesquisa dos ICAs positiva e a doença clínica estava presente em 10 dos 13 pacientes que eram positivos para os anticorpos anticélula da ilhota, sendo que em dois destes pacientes os sintomas de diabetes mellitus apareceram após a detecção dos anticorpos no soro.

Quase simultaneamente foi descrito o achado de anticorpos circulantes contra células da ilhota em 5 pacientes com DMID e auto-imunidade coexistente, reforçando a hipótese de que existiria uma forma auto-imune de diabetes (MACCUISH et al. 1974). Os autores sugeriram pelos seus dados que os ICAs não poderiam ser detectados em pacientes que, além de diabetes, não apresentassem outras doenças auto-imunes maiores, o que mais tarde não foi confirmado. Já especulavam que o fato de terem sido incluídos em tentativas anteriores soros de pacientes com diabetes tipo II, nos quais uma doença de etiologia auto-imune seria improvável, poderia ser uma das explicações para as falhas nas detecções. E concluíram que outros estudos seriam necessários para confirmar a órgão-especificidade dos ICAs e caracterizar a natureza e localização do(s) antígenos(s) contra os quais os anticorpos antiilhota seriam dirigidos.

A própria topografia dispersa das células da ilhota pancreática já foi considerada uma barreira técnico-anatômica a qualquer esforço de pesquisa ou terapêutico (MONCAYO et al., 1988). Seja qual for o motivo, tentativas de isolar, caracterizar e purificar o(s) antígeno(s) da ilhota contra o qual(is) os ICAs estariam dirigidos, buscando facilitar o desenho de protocolos de larga escala, ainda não foram totalmente bem sucedidas.

Moléculas contra as quais os ICAs reagem aparecem antes da 12^a semana de gestação e aparentemente estão presentes em todas as células da ilhota (DE KRIJGER et al., 1994). Acredita-se que qualquer antígeno que esteja em maior densidade nas ilhotas ou que, por uma variedade de razões, sobreviva melhor dentro das ilhotas do que no pâncreas acinar, à preparação dos cortes congelados de pâncreas, poderia ser reconhecido por anticorpos e contribuir para a positividade dos ICAs (GIANANI e EISENBARTH, 1996). Assim, anticorpos a diferentes antígenos da ilhota poderiam todos resultar em um soro considerado ICA-positivo e soros individuais seriam freqüentemente misturas de anticorpos a diferentes antígenos da ilhota (PALMER, 1993).

ICAs são detectados no soro humano apenas em títulos relativamente muito baixos, o que poderia estar relacionado à carga de antígenos, ou seja, a massa relativamente pequena de células da ilhota, ou mesmo a inadequações técnicas (VARDI et al., 1987). Com respeito a este último item, desde os primeiros relatos (BOTTAZZO, FLORIN-CHRISTENSEN e DONIACH, 1974; MACCUISH et al., 1974) foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta e conjugado fluoresceína-isotiocianato anti-IgG humana (WELLCOME®), com pâncreas humano fresco, congelado imediatamente após a retirada, em cortes de 5-7 μ m obtidos em um criostato. Este método foi posteriormente padronizado (GLEICHMANN e BOTTAZZO, 1987), conforme discutiremos mais tarde.

A prevalência destes anticorpos por ocasião do diagnóstico do diabetes tipo I vem sendo relatada entre 50 e 84% (ASSA et al., 1985; LERNMARK et al., 1981;

BORSEY et al., 1983; RILEY e MACLAREN, 1984; ANDREANI, DI MARIO e POZZILLI, 1991; LANDIN-OLSSON et al., 1992), em diferentes populações .

Em parentes de primeiro grau de pacientes diabéticos tipo I, a prevalência de ICAs é descrita entre 2,0 a 5,0% (RILEY e MACLAREN, 1984; RILEY et al., 1990; THIVOLET et al., 1991; SKYLER e MARKS, 1993), enquanto somente 0,3 a 0,5% dos controles sadios apresentam anticorpos contra células da ilhota (NOTSU et al., 1985; RILEY e MACLAREN, 1984; SKYLER e MARKS, 1993). Casos de ICAs transitórios ou flutuantes são considerados raros, embora sejam descritos casos em que os ICAs intermitentemente desapareceram e reapareceram (RILEY e MACLAREN, 1984). Foram ainda detectados ICAs em 4% (6/137) de diabéticos tipo II tratados com insulina e em 2% (1/58) daqueles tratados com hipoglicemiantes orais; não foram detectados em nenhum de 84 diabéticos tipo II recebendo apenas dieta ou 8 pacientes com diabetes associado à pancreatite crônica (KOBAYASHI et al., 1981).

Na maioria dos pacientes com DMID, os ICAs desaparecem entre 6 meses a 3 anos após o diagnóstico (LERNMARK et al., 1981; BORSEY et al., 1983; ASSA et al., 1985). Seu desaparecimento da circulação, na maior parte dos pacientes com diabetes tipo I, vem sendo creditado à falta de estímulo antigênico, secundária ao desaparecimento das células beta; entretanto, em um subgrupo destes pacientes, particularmente com evidência de outras desordens auto-imunes, ICAs persistem por mais tempo e em maiores títulos (BOTTAZZO et al., 1978; PUJOL-BORRELL et al., 1981). Por outro lado, a maioria dos pacientes com síndrome poliendócrina auto-imune expressaria o que vêm sendo denominados ICAs “seletivos” ou restritos (GENOVESE et al., 1992 citados por BONIFACIO, 1996). Este tipo de ICAs reage somente com células β de rato e não de camundongo e parece conferir um baixo risco de diabetes tipo I em comparação com os ICAs não-restritos, tanto para pacientes com síndrome poliendócrina como para parentes de pacientes com diabetes tipo I.

Uma proporção dos ICAs são fixadores de complemento (CF-ICAs), o que foi inicialmente relacionado à instalação clínica da doença, podendo ainda refletir mais seletivamente o dano às células beta pancreáticas (BOTTAZZO et al., 1980). Analisando

a frequência destes ICAs fixadores de complemento, foi encontrada uma positividade de 30% de CF-ICAs em 30 pacientes diabéticos ao diagnóstico e de 23% aos 6 meses (BORSEY et al., 1983). Todos os pacientes com CF-ICAs ao diagnóstico eram ICA-positivos, enquanto somente 47% dos pacientes com ICAs também tinham CF-ICAs no soro. Na verdade, CF-ICAs têm mostrado meramente refletir altos títulos de ICAs convencionais (GLEICHMANN e BOTTAZZO, 1987; VARDI et al., 1987; GOMES et al., 1990). Em um estudo da progressão para diabetes tipo I em pacientes com autoimunidade endócrina e ICAs, foi demonstrado que esta evolução está relacionada com a quantidade de ICAs representada por altos títulos, persistência dos ICAs e fixação do complemento (BOSI et al., 1991). Esta última informação é complementar às observações iniciais de que anticorpos tireoideanos e gástricos eram mais prevalentes em pacientes com diabetes instalado e CF-ICAs persistentes, do que naqueles que perdiam esta “subespécie” de anticorpos (BOTTAZZO et al., 1980).

Paralelamente a estes estudos, outras estratégias foram sendo desenvolvidas para a detecção dos ICAs. Cada uma destas técnicas, as quais basicamente diferem na natureza do substrato e reagentes empregados, tempo de incubação, na fixação ou não do tecido e no índice escolhido para a quantificação dos resultados, tem suas próprias vantagens, desvantagens, falhas e limitações, a quais serão brevemente discutidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

FASE I: seleção de um pâncreas humano adequado como substrato e implantação e validação da técnica de detecção dos ICAs.

1 Obtenção do tecido pancreático

O tecido pancreático foi obtido de 6 doadores, todos do grupo O, durante um período de 4 anos. O primeiro pâncreas, o único proveniente de cadáver, com 6 horas de pós-morte, apresentava sinais de autólise à análise pela coloração hematoxilina-eosina e não se mostrou adequado quando submetido a testes preliminares com soros controle ICA-positivo e ICA-negativo. O pâncreas número 2 foi resultante de pancreatectomia por câncer, paciente feminina com 46 anos. Os demais foram provenientes do Serviço de Captação de Órgãos para Transplantes, em Curitiba, obtidos de doadores previamente saudáveis, em morte cerebral por processos traumáticos intracranianos e em condições hemodinâmicas estáveis, idades entre 18 e 31 anos, dois deles do sexo masculino e dois do sexo feminino. O procedimento referente ao transporte e conservação do pâncreas, bem como a montagem das lâminas e realização dos ensaios propriamente ditos, é descrito abaixo e foi idêntico para todas as amostras.

Inicialmente procurou-se encontrar um substrato com boa antigenicidade para a realização da pesquisa dos ICAs. Para tanto, os pâncreas humanos obtidos foram sucessivamente submetidos à avaliação com soro negativo e soro controle positivo diluído até 1:16, até ser encontrado um substrato capaz de apresentar forte positividade nesta diluição, o que foi conseguido apenas com o pâncreas número 6. Foi então realizada uma avaliação dos tecidos obtidos, comparando-se paralelamente os 5

pâncreas (já excluído o de cadáver), através de aferição sem o conhecimento prévio das amostras específicas testadas, de 10 amostras de soro provenientes da Universidade de Minnesota, Minneapolis.

A presença dos ICAs foi também determinada sem o conhecimento prévio das amostras específicas testadas, pela visão da imunofluorescência na ilhota ao microscópio e os resultados anotados por dois observadores, conforme o número na lâmina. Todas os testes foram realizados em duplicata. Os resultados observados foram registrados como negativos ou, quando positivos, pelo valor final de diluição com resultado positivo. Em caso de discordância entre as leituras, as amostras eram reanalisadas em outro ensaio. Persistindo a discordância, ou em casos de positividade referida como “fraca”, a amostra era considerada negativa e o resultado fornecido como a última diluição na qual ambos os observadores constataram a positividade. Todas as amostras foram analisadas até a diluição de 1:8, inclusive as negativas, para investigação do “efeito prozona” (OLSSON, SUNDKVIST e LERNMARK., 1987). Amostras positivas até 1:8 foram analisada até a diluição de 1:64. A variação interensaio foi avaliada com amostras de soro controle ICA-positivo, soro controle ICA-negativo e PBS em todos os ensaios. A variação intraensaio foi aferida pela realização sistemática dos testes em duplicata.

2 Estabelecimento da curva padrão

Após a seleção do pâncreas mais adequado conforme comparação com soros de titulações posteriormente conhecidas, foi iniciada a pesquisa dos ICAs em amostras constituídas pela diluição sucessiva das próprias diluições do soro de referência JDF, visando a construção de uma curva padrão (BOITARD, et al., 1988; BONIFACIO et al., 1990). Tal curva permite a expressão dos resultados em unidades JDF, conforme convenção (LANDIN-OLSSON, 1990) (Figura 5).

3 O método

ICAs em nossos ensaios foram determinados por imunofluorescência indireta em cortes congelados de pâncreas humano do grupo O, usando soro fluoresceinado anti-IgG humano, como descrito por BOTTAZZO, FLORIN-CHRISTENSEN e DONIACH (1974) e implantado no laboratório do Dr. Jose Barbosa, University of Minnesota, Minneapolis.

3.1 Congelamento do tecido pancreático

A fim de se promover um quase imediato congelamento do tecido, evitando a autólise, pequenos blocos com aproximadamente 5 mm de tecido pancreático foram mergulhados por até um minuto em uma pequena cuba com “Tissue Tek - OCT Compound” (MERCK®), envolta em nitrogênio líquido. Imediatamente após, os fragmentos de pâncreas foram acondicionados em tubos plásticos fechados e previamente resfriados em nitrogênio líquido. Os tubos plásticos foram então mantidos imersos no gelo seco até o transporte ao recipiente de nitrogênio líquido, onde permaneceram estocados.

3.2 Preparação de lâminas

Após terem sido concluídas as etapas relativas à obtenção e conservação dos pâncreas, teve início o processo de realização dos ensaios propriamente ditos. O primeiro passo desta fase consistiu na preparação das lâminas que posteriormente receberiam os cortes de pâncreas, através do banho em gel para imunofluorescência.

Para a feitura do gel foram utilizados:

500 ml de água destilada

2,5 g de gelatina (SIGMA®)

0,5 g $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA®)

A água destilada foi aquecida a 60°C e os demais ingredientes foram adicionados, sob agitação constante. Após a imersão no gel, as lâminas foram colocadas em estufa a 17°C, para secar por um tempo aproximado de 2 horas antes da

realização dos cortes no criostato. Preferencialmente, as lâminas foram preparadas no dia anterior ao do ensaio, sendo armazenadas a 4°C; sob estas condições as lâminas permanecem adequadas para uso por 3 semanas.

3.3 Criotomia do tecido pancreático

Para a realização dos cortes do pâncreas em criostato (STARLET-BRIGHT, UK), a temperatura do aparelho foi ajustada para -20°C, lâminas com gel foram pré-congeladas dentro da câmara e o pedaço de pâncreas mantido no nitrogênio líquido até a hora de montar o tecido. Quando da montagem do pâncreas procurava-se agir rapidamente para não permitir seu aquecimento; o criostato foi ajustado para 4 µm, dois cortes foram colocados em cada lâmina e estas imediatamente levadas a -20°C. As lâminas com o tecido são passíveis de utilização por um mês.

3.4 Preparo da solução tampão e preservadora

Solução tampão fosfato-salina (PBS):

NaCl - 43,84 g (MERCK®)

Na₂HPO₄ - 7,4 g (MERCK®)

KH₂PO₄ - 2,15 g (MERCK®)

Os componentes foram adicionados a 5 litros de água deionizada e o pH ajustado entre 7,2 a 7,4.

Meio de montagem (p-fenilenodiamina-PBS-glicerol):

PBS - 10 ml

p-Fenilenodiamina - 100 mg (SIGMA®)

Glicerol - 90 ml (MERCK®)

Este meio de montagem tem como objetivo retardar o enfraquecimento da imunofluorescência durante a microscopia (JOHNSON e ARAUJO, 1981).

3.5 Preparação dos anticorpos e reação de imunofluorescência indireta

Os soros foram removidos do freezer 15 minutos antes de começar cada ensaio. Cada corte de tecido foi circunscrito e numerado ao acaso, para garantir a leitura cega das lâminas codificadas, por dois observadores independentes. A seguir 0,025 ml de soro foram colocados sobre cada corte, cobrindo bem o tecido e as lâminas foram colocadas em câmara úmida por 20 minutos. Após a remoção do excesso de soro, estas foram colocadas em banho em PBS, em três etapas subseqüentes de 5 minutos, agitando suavemente; as lavagens objetivam remover os componentes do soro não-ligados. As lâminas foram removidas do banho e secas individualmente, com cuidado para não tocar o tecido. A próxima etapa foi a colocação sobre cada corte de tecido de 0,025 ml do anti-IgG humano ligado à fluoresceína, Fab específico (KALLESTAD®), desenvolvido em cabra e diluído a 1:64 em PBS. As lâminas foram então novamente incubadas em câmara úmida e escura por 20 minutos e novamente lavadas em PBS em três etapas subseqüentes de 5 minutos, sob agitação suave. Por fim as lâminas foram removidas e secadas individualmente, colocando-se uma pequena gota do PPD-PBS glicerol e uma lamínula sobre cada corte, selando-se com esmalte.

FASE II: Avaliação da prevalência de ICAs em pacientes com diabetes tipo I recém-diagnosticado e em irmãos não-diabéticos de portadores de diabetes tipo I, através da aplicação da técnica recém-implantada.

1 Seleção dos grupos para estudo

Foram estudados dois grupos de pessoas, sendo o primeiro de 50 pacientes com DMID, idade média de 9 anos (amplitude de variação de 4 meses a 24 anos), relação masculino/feminino 0,85 (23:27) e sintomatologia da doença por um período inferior a 8 semanas. O outro grupo testado consistiu de 40 irmãos não-diabéticos de portadores da doença, não relacionados com o grupo anterior, idade média de 10,6 anos (amplitude de variação de 2 a 25 anos) e relação masculino/feminino 0,76 (18:22).

Após consentimento informado, uma amostra de 5 a 10 ml de sangue foi colhida sem anticoagulante, de uma veia periférica de cada um dos participantes, sendo o soro separado por centrifugação e guardado em duplicata a -20°C.

2 Aferição dos valores de ICAs

A técnica descrita e implantada foi aplicada aos soros dos dois grupos estudados.

METODOLOGIA ESTATÍSTICA

A análise comparativa das titulações entre os pacientes com diabetes tipo I recém-diagnosticados com irmãos de portadores de diabetes tipo I, foi realizada através do teste qui-quadrado para amostras independentes, considerando-se em cada um dos grupos os pacientes com leituras positivas e negativas.

Os testes estatísticos foram realizados no programa EPI-INFO (1990) da OMS.

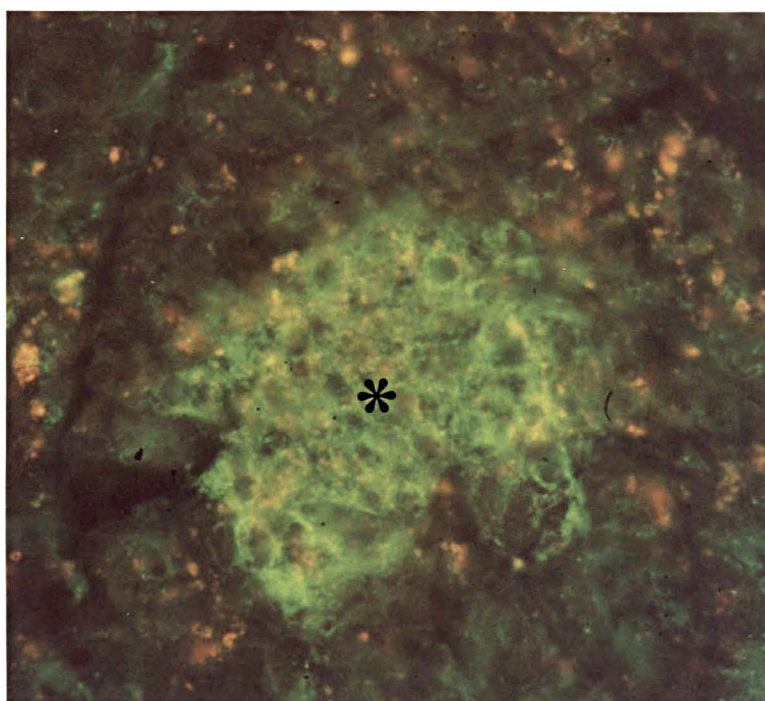
As decisões foram tomadas considerando o nível de significância estatística de 5%.

RESULTADOS

RESULTADOS

A imunofluorescência citoplasmática, envolvendo difusamente as células da ilhota, foi detectada por dois observadores independentes, sem o conhecimento prévio das amostras específicas testadas.

FIGURA 4 - ILHOTA DE LANGERHANS POSITIVA À PESQUISA DE ICAs



Corte histológico de pâncreas humano, demonstrando ILHOTA DE LANGERHANS (*) fortemente corada pela fluoresceína (Imunofluorescência X 400).

Os resultados da análise de 10 amostras de soro fornecidas pela Universidade de Minnesota (*), utilizando-se os pâncreas de 2 a 6 (já excluído o pâncreas obtido de cadáver) como substrato, foram comparados com os resultados posteriormente fornecidos por aquela Universidade (Tabela 1).

TABELA 1 - RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SORO DA UNIVERSIDADE DE MINNESOTA, COM OS PÂNCREAS Nº 2 A 6

	P#2	P#3	P#4	P#5	P#6	*MINNESOTA
IDADE DOADOR	46	18	24	31	22	
SEXO DOADOR	F	M	F	M	F	
1.	N	N	N	N	N	N
2.	1:1	1:2	1:4	1:2	1:16	1:16
3.	N	N	N	N	N	N
4.	1:1	1:1	1:16	1:4	1:64	1:64
5.	1:1	1:1	1:1	N	1:1	1:1
6.	1:1	1:1	1:2	1:4	1:4	1:8
7.	1:1	1:1	1:2	1:1	1:4	1:4
8.	N	N	N	N	N	N
9.	N	N	N	N	N	N
10.	1:1	N	1:1	N	1:1	1:1

P = PÂNCREAS

M = MASCULINO

F = FEMININO

N = NEGATIVO

Titulação = nível de positividade

A análise comparativa entre os resultados obtidos na Universidade de Minnesota e os testes realizados com os pâncreas de 2 a 6 é apresentada na tabela 2.

TABELA 2 - CONCORDÂNCIA DOS PÂNCREAS DE Nº 2 A 6, EM RELAÇÃO AOS SOROS DA UNIVERSIDADE DE MINNESOTA

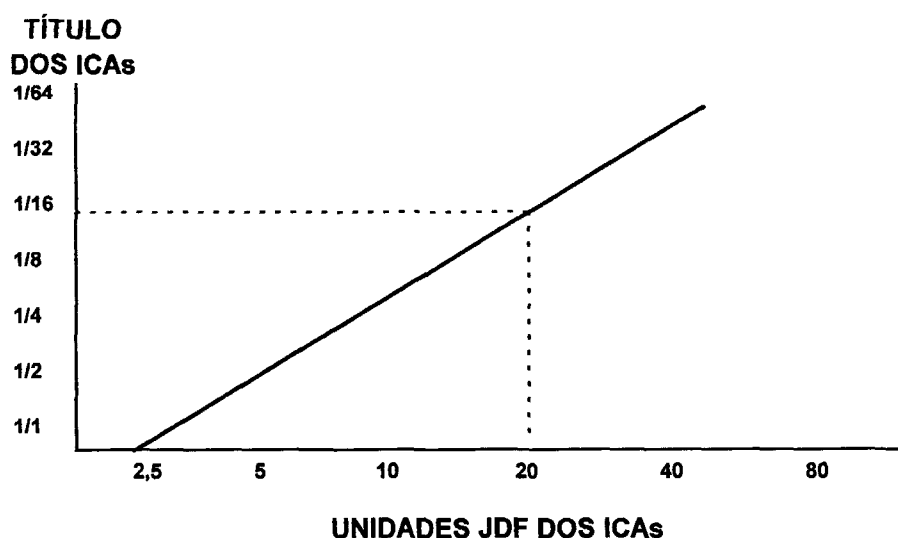
CONCORDÂNCIA	P#2	P#3	P#4	P#5	P#6
SIM	6	5	6	4	9
NÃO	4	5	4	6	1

P = PÂNCREAS

Com base nos dados apresentados na tabela 2, foi selecionado para utilização nos demais testes o pâncreas de número 6, o qual apresentava não só o maior número de concordâncias (9 em 10) em relação ao soros testados na Universidade de Minnesota, como apresentava a única discordância em apenas um passo de diluição, o que não teria significância clínica.

Antes da análise dos soros de diabéticos e familiares de pacientes com diabetes tipo I, foi construída uma curva padrão com um soro internacional de referência (BOITARD, et al., 1988; BONIFACIO et al., 1990), a fim de possibilitar a expressão dos resultados em unidades JDF (*Juvenile Diabetes Foundation*). Foi determinado o título final para cada diluição como se segue (Tabela 3) e expresso no eixo x a diluição testada e no eixo y o título final de cada diluição (Figura 5).

FIGURA 5 - EXPRESSÃO REPRESENTATIVA DE DADOS, DE ACORDO COM A CURVA DE REFERÊNCIA PARA UNIDADES JDF



O \log_2 das unidades JDF para cada padrão são representados graficamente contra o \log_2 do título recíproco de ICA para cada padrão. Considerou-se, em concordância com o estipulado pelo Workshop (BONIFACIO, LERNMARK e DAWKINS, 1988), o título final para o soro não-diluído como correspondendo a 80 unidades JDF, para a diluição 1:2 40 unidades, etc.. (LANDIN-OLSSON, 1990).

TABELA 3 - TÍTULO FINAL PARA CADA DILUIÇÃO, A PARTIR DO SORO NÃO-DILUÍDO E DE DILUIÇÕES SUBSEQÜENTES

DILUIÇÃO	LEITURA ICAs
Soro 1/1	+
1/2	+
1/4	+
1/8	+
1/16	+
1/32	+
1/64	+
Soro 1/2	+
1/2	+
1/4	+
1/8	+
1/16	+
1/32	+
1/64	N
Soro 1/4	+
1/2	+
1/4	+
1/8	+
1/16	+
1/32	N
1/64	N
Soro 1/8	+
1/2	+
1/4	+
1/8	+
1/16	N
1/32	N
1/64	N
Soro 1/16	+
1/2	+
1/4	+
1/8	N
1/16	N
1/32	N
1/64	N

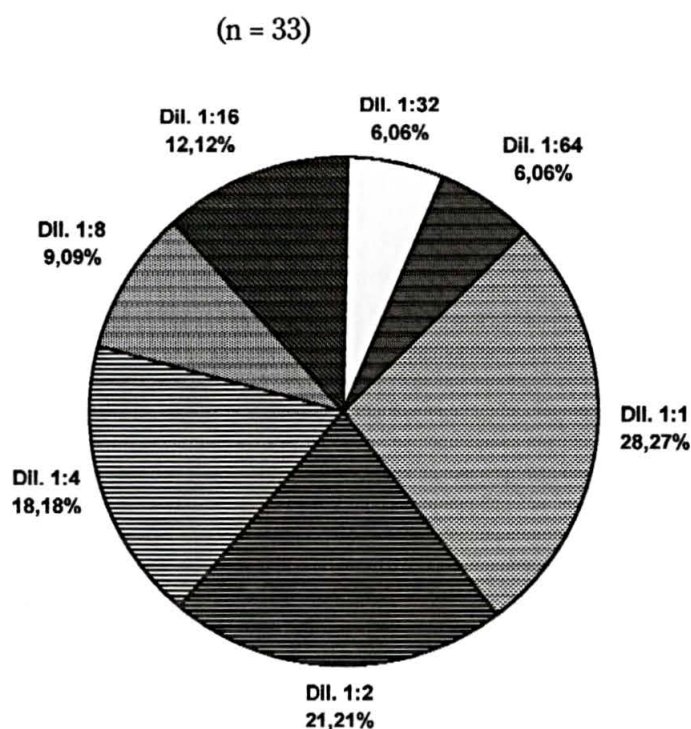
TABELA 3 - TÍTULO FINAL PARA CADA DILUIÇÃO, A PARTIR DO SORO NÃO-DILUÍDO E DE DILUIÇÕES SUBSEQÜENTES (cont.)

DILUIÇÃO	LEITURA ICAs
Soro 1/32	+
1/2	+
1/4	N
1/8	N
1/16	N
1/32	N
1/64	N
Soro 1/64	+
1/2	N
1/4	N
1/8	N
1/16	N
1/32	N
1/64	N

Nos anexos 1 e 2 são relacionados os resultados obtidos em pacientes com diabetes tipo I, sintomáticos por um período inferior a 8 semanas antes da coleta do sangue e em irmãos de portadores da doença.

Assim, dentre os portadores de diabetes tipo I com sintomas por um período inferior a 8 semanas, 66% (33/50) mostraram resultado positivo para a presença dos ICAs. Destes, 9 (27,2%) foram positivos apenas com o soro não diluído, 7 (21,2%) até 1/2, 6 (18,1%) até 1/4, 3 (9,1%) até 1/8, 4 (12,1%) até 1/16, 2 (6,1%) até 1/32 e 2 (6,1%) até 1/64 (Figura 6). Já dentre os irmãos de diabéticos, a positividade obtida foi de 2 casos em 40 estudados (5%), um deles positivo até a diluição 1/2 e o outro até 1/8.

FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM RESULTADO POSITIVO, DE ACORDO COM A DILUIÇÃO DO SORO



Os resultados das comparações entre idades, sexos e ocorrência ou não de cetoacidose, não foram significativos e não permitiram a construção do modelo multivariado de regressão logística. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com diferentes idades, sexos e resultados de cetoacidose. As tabelas a seguir (4,5 e 6) e as figuras 7, 8 e 9 são descritivas das amostras pesquisadas.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES E IRMÃOS DOS PACIENTES PESQUISADOS DE ACORDO COM A IDADE E O RESULTADO DA LEITURA

IDADE	PACIENTES		IRMÃOS DE PACIENTES	
	LEITURA POSITIVA	LEITURA NEGATIVA	LEITURA POSITIVA	LEITURA NEGATIVA
ATÉ 4 ANOS	11	2	0	6
DE 5 A 9 ANOS	10	7	0	12
DE 10 A 14 ANOS	9	3	1	11
DE 15 A 19 ANOS	2	2	1	7
MAIS DE 20 ANOS	1	3	0	2
TOTAL	33	17	2	38

FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES PESQUISADOS, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA E O RESULTADO DA LEITURA

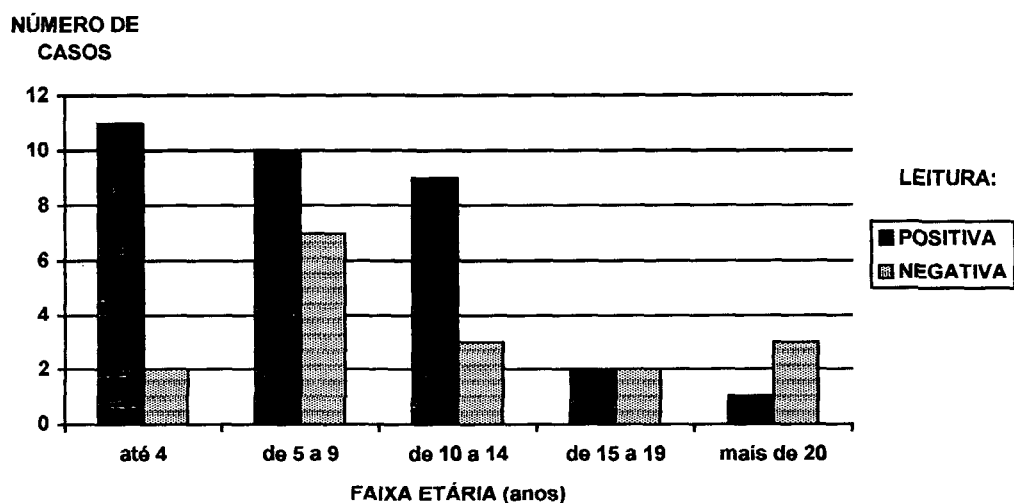


TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES E IRMÃOS DOS PACIENTES PESQUISADOS DE ACORDO COM O SEXO E O RESULTADO DA LEITURA

SEXO	PACIENTES		IRMÃOS DE PACIENTES	
	LEITURA POSITIVA	LEITURA NEGATIVA	LEITURA POSITIVA	LEITURA NEGATIVA
MASCULINO	14	9	1	17
FEMININO	19	8	1	21
TOTAL	33	17	2	38

FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES PESQUISADOS, SEGUNDO O SEXO E O RESULTADO DA LEITURA

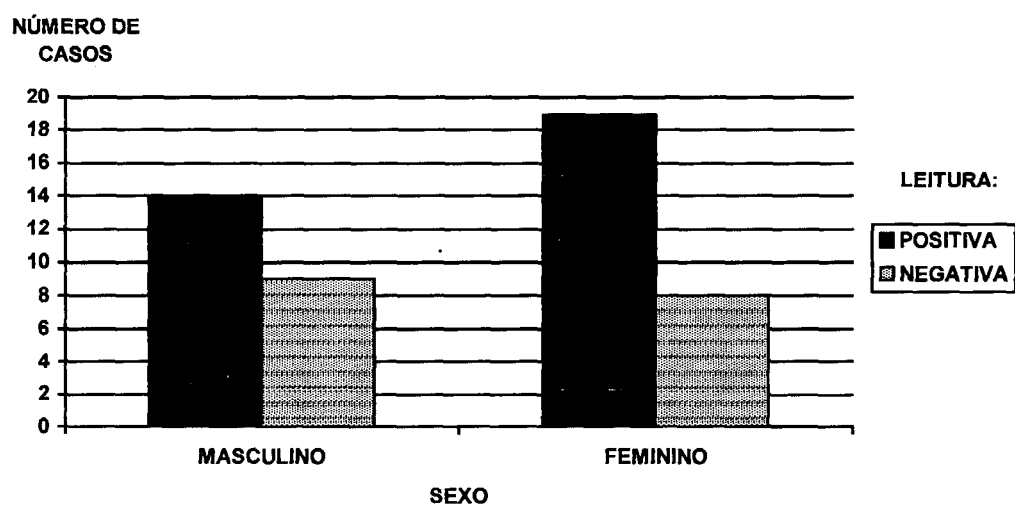
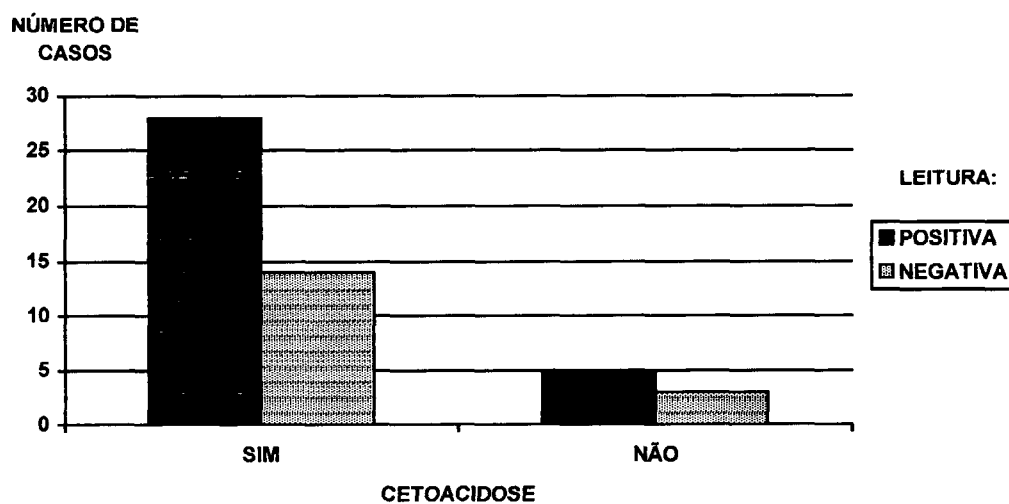


TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES E IRMÃOS DOS PACIENTES PESQUISADOS, DE ACORDO COM A OCORRÊNCIA OU NÃO DE CETOACIDOSE E O RESULTADO DA LEITURA

CETOACIDOSE	PACIENTES	
	LEITURA POSITIVA	LEITURA NEGATIVA
SIM	28	14
NÃO	5	3
TOTAL	33	17

FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES PESQUISADOS, SEGUNDO A OCORRÊNCIA OU NÃO DE CETOACIDOSE E O RESULTADO DA LEITURA



A concordância total entre o primeiro e segundo observador na leitura das lâminas foi de 94% para a primeira leitura. Diferenças de leitura foram observadas apenas em diluições iguais ou superiores a 1/8, com as discordâncias limitadas a 1 ponto na escala de diluição. Nestes casos foi sempre repetido o teste, considerando-se então para efeito de resultado a última diluição na qual houve concordância na leitura. Controles ICA-negativo, ICA-positivo e PBS tiveram sempre leitura compatível, por ambos os observadores. Em nenhum caso foi observada a conversão de um resultado negativo para positivo, com a diluição até 1/8 de amostras consideradas negativas a 1/1.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

É conhecido que as manifestações clínicas do diabetes tipo I decorrem da destruição das células pancreáticas além de um nível crítico (EISENBARTH, 1986). Qualquer que seja o mecanismo desencadeante da seqüência de eventos, o curso desta destruição pode levar anos (SRIKANTA et al., 1983; BENNETT, 1985). Desta maneira, se o paciente em questão puder ser identificado, abre-se a possibilidade de deter o processo auto-imune antes da instalação clínica da doença. Intervir nesta fase, entretanto, significa submeter a tratamento um indivíduo sadio e assintomático, que não apresenta risco de progredir para uma doença fulminante. Portanto, é necessário que o índice de predição seja tão mais acurado quanto menos inócuo for o tratamento preventivo. Além disso, deve-se aceitar um risco maior de efeitos colaterais apenas nos assim chamados estádios avançados ou tardios de "pré-diabetes" (SKYLER e MARKS, 1993). Torna-se então fundamental estudar a história natural da doença e seus possíveis marcadores.

Apesar dos problemas potenciais do ensaio, os quais serão brevemente discutidos, os ICAs emergiram precocemente como os mais potentes indicadores de risco para o DMID, em parentes de primeiro grau de portadores da doença (ASSA et al., 1985). Desta forma, a maior parte dos principais estudos de observação da história natural do diabetes tipo I já iniciados e mesmo as primeiras tentativas de intervir neste processo, dependeram da capacidade dos ICAs para identificar pacientes com "pré-diabetes". A implantação da técnica de pesquisa destes anticorpos em vários lugares do mundo, vem permitindo aumentar o número de pessoas nestes estudos, possibilitando ainda a avaliação de eventuais diferenças regionais.

A pesquisa por imunofluorescência indireta, com cortes em criostato de pâncreas humano do grupo sanguíneo O, congelado e não-fixado, constitui o método padrão para detecção dos ICAs (GLEICHMANN e BOTTAZZO, 1987). Entretanto, um dos grandes problemas na realização destes ensaios foi sempre a dificuldade de obtenção de pâncreas humano de paciente jovem, além da variação de sensibilidade entre diferentes órgãos.

Aparentemente o resultado do teste para pesquisa dos ICAs parece depender mais da amostra pancreática do que da variação interobservador (MARNER et al., 1982). Em uma análise de cinco pâncreas humanos, todos do grupo sanguíneo O e congelados instantaneamente em metilbutano pré-resfriado em nitrogênio líquido, foram comparados os cortes não-fixados dos dois pâncreas com maior antigenicidade. A maior parte dos soros de diabéticos tipo I era positiva para os ICAs, porém 8 de 50 soros eram positivos em apenas um dos dois tecidos (KOLB et al., 1983). No presente estudo, foi realizada a comparação de um número semelhante de pâncreas, constatando-se diferenças de antigenicidade menos marcantes. Por outro lado, pâncreas obtido no período pós-morte é considerado, em geral, inadequado para a detecção dos ICAs, porque quanto mais longo o tempo de isquemia menos apropriado torna-se este tecido como substrato (BONIFACIO, 1996). Em concordância, também no presente estudo, um pâncreas retirado seis horas após a morte apresentava sinais evidentes de autólise à análise pela coloração hematoxilina-eosina e foi excluído das demais análises.

Compreende-se, então, as tentativas persistentes de se utilizar um outro tipo de substrato para a pesquisa dos ICAs, porém variações interespecies tornam o uso do pâncreas humano praticamente obrigatório (BONIFACIO, 1996), como consideramos em nosso estudo.

Estudos iniciais relataram a utilização de pâncreas de rato e cobaia, concomitantemente à utilização de pâncreas humano, com os anticorpos reagindo com pâncreas de ambos os animais (BOTTAZZO et al., 1974). Enquanto trabalhos posteriores mostraram resultados conflitantes tanto nestes animais como em

camundongo, carneiro e porco, outro estudo mostrou resultados idênticos em pâncreas humano e de camundongo, testando soros de pacientes com diabetes do tipo I (ZEIDLER, 1982).

Um ensaio foi desenvolvido, o qual utilizava pâncreas de rato Wistar-Furth como substrato, um anticorpo monoclonal antiilhota (A2B5) para identificar as ilhotas e uma proteína A conjugada à fluoresceína para identificar os anticorpos dos pacientes (DIB et al. 1987). Além da utilização de um diferente tipo de substrato, este ensaio expressava também a preocupação com a identificação das ilhotas e a redução do risco de reações falso-negativas. Outra modificação com relação à técnica original, no mesmo trabalho, foi a substituição do anti-IgG pela proteína A conjugada à fluoresceína, como reagente de detecção dos ICAs. Foi sugerido que o rato expressaria um antígeno idêntico ou similar ao do pâncreas humano. Outro ensaio de duas cores, o assim chamado método da proteína A-anticorpo monoclonal (ICAs-pA), foi desenvolvido com o objetivo de reduzir a interferência da coloração acinar pancreática e facilitar a padronização do ensaio para a detecção dos ICAs, utilizando ainda um fotômetro para a quantitação específica da imunofluorescência das células da ilhota (SRIKANTA et al., 1985).

A proteína A marcada pela peroxidase também foi utilizada para tratar à temperatura ambiente cortes congelados de pâncreas humano, incubados com amostras de soro e submetidos à coloração pelo HE. Ao contrário da técnica por imunofluorescência, este método ofereceria como vantagem o fato de que tecidos pancreáticos humanos poderiam ser usados independentemente da idade e grupo sanguíneo, além de que os cortes corados poderiam ser armazenadas por mais de 5 anos. Através deste método, ICAs foram detectados em todos os 14 pacientes com diabetes tipo I clinicamente instalado por um período inferior a 6 meses.

Além da utilização de diferentes substratos e do ensaio de duas cores, outras alternativas foram propostas para melhorar a sensibilidade do ensaio padrão. Uma destas variações estudadas foi o prolongamento do período de incubação do soro, de 30 minutos para 24 horas (PILCHER e ELLIOTT, 1984). Neste caso, soros foram

diluídos a 3/1 em uma solução de salina tamponada em fosfato e aprotinina, com o objetivo de diminuir a quantidade de precipitação de interferência, a qual ocorre com o tempo de incubação mais longo. Todos os 22 soros ICA-positivos examinados previamente mostraram um aumento recíproco nos títulos com o prolongamento do período de incubação, os fatores de incremento variando de 2 a 32. Já em um grupo de 76 pacientes com DMID recém diagnosticado, a frequência revista de positividade foi de 92%, ou seja, 78% de 27 soros considerados inicialmente ICA-negativos foram achados positivos com o novo ensaio. Postulou-se, então, que se o ensaio fosse tornado ainda mais sensível a taxa de positividade ao diagnóstico deveria chegar muito próximo de 100%. Ainda, dos 127 soros normais (105 crianças e 22 adultos) diluídos à metade, somente 1 foi positivo com a técnica modificada, apresentando um aumento no título de 2 para 8 com relação à técnica convencional, o que aparentemente indicaria que o aumento na sensibilidade não se dá às custas da especificidade. Torna-se difícil, entretanto, excluir perda de especificidade dos ICAs em qualquer população estudada com ensaios mais sensíveis, na ausência de dados sobre a evolução dos casos de pessoas não-diabéticas e positivas para os ICAs em cada estudo. Por esta razão, foi optado pelo não-prolongamento do período de incubação.

Posteriormente, outro estudo procurou avaliar a repercussão do prolongamento do tempo de incubação no ensaio de duas cores, utilizando um anticorpo monoclonal para a detecção das células beta pancreáticas (OLSSON, SUNDKVIST e LERNMARK, 1987). Este novo ensaio foi também realizado na presença de aprotinina como inibidora de proteólise. O objetivo do estudo foi encontrar o tempo ótimo de incubação, além de determinar a prevalência dos ICAs no DMID recém-diagnosticado e validar este ensaio no pré-diabetes. No ensaio convencional de duas cores, ICAs foram positivos em 53/70 (76%) de diabéticos tipo I até no máximo um mês do início da insulinoterapia, em 1/50 dos controles e 2/97 dos irmãos depois de 30 minutos de incubação. O título médio final dos ICAs, o qual era de 1/16 para a incubação por 30 minutos, aumentou significativamente para 1/32 depois de 18 horas de incubação e para 1/64 depois de 24 horas de incubação. Entretanto, como não houve diferença

significativa entre o título final com 18 e 24 horas, o ensaio de 24 horas foi utilizado apenas na primeira série de experimentos. A incubação prolongada para 18 horas aumentou a prevalência de amostras ICA-positivas para 62/70 (89%) nos diabéticos e 2/50 em controles, enquanto a prevalência em irmãos não foi modificada. Nos pacientes diabéticos o título médio era de 1/32 aos 30 min. e 1/64 após 18 horas de incubação.

Ainda no trabalho de OLSSON, SUNDKVIST e LERNMARK (1987) foi referido que 16% das amostras de crianças que eram negativas a 1/2, foram consideradas positivas em diluições maiores, uma situação já conhecida como "efeito prozona". O "efeito prozona" seria dependente de um excesso de anticorpos, inibindo a ligação normal antígeno-anticorpo nas reações com soro não diluído; esta ocorrência não foi observado em nossas análises.

No estudo aqui relatado, a frequência encontrada de positividade para os ICAs foi de 33 em 50 pacientes (66%) com diabetes tipo I, concordante com os achados da literatura em outros grupos populacionais (LERNMARK et al., 1981; BORSEY et al., 1983; ASSA et al., 1985; LANDIN-OLSSON et al., 1992).

FIGURA 10 - PREVALÊNCIAS DE ICAs NO DMID RECÉM-DIAGNOSTICADO

LERNMARK et al., 1981	67 %
BORSEY et al., 1983	50 %
ASSA et al., 1985	± 60 %
LANDIN-OLSSON et. a al., 1992	84 %
RÉA, 1996	66%

Porém, a prevalência de resultados positivos encontrada no grupo de irmãos de diabéticos, 2 em 40 (5%) pessoas, pode ser considerada um pouco acima da média observada na literatura (RILEY et al., 1990; THIVOLET et al., 1991). Este último achado poderia ser atribuído a características populacionais ou à boa antigenicidade do pâncreas; entretanto, pode ter sido observada simplesmente pelo pequeno tamanho da amostra, insuficiente para tal conclusão. A ausência de significância estatística na comparação dos dados referentes às idades, sexos e apresentação clínica do DMID (presença ou ausência de cetoacidose), em indivíduos ICA-positivos e ICA-negativos, é concordante com a literatura em sua maior parte (THAI e EISENBARTH, 1993), embora novamente o número de casos seja muito pequeno para estimular outras inferências.

A relevância dos dados relacionados ao grupo de irmãos de diabéticos prende-se ao fato deste ser um grupo com maior probabilidade de resultados positivos que a população geral, possibilitando uma melhor comparação com o grupo de diabéticos recém-diagnosticados, os quais apresentam alta probabilidade pré-teste de positividade para os ICAs, segundo a própria literatura. A utilização dos dados referentes aos irmãos de diabéticos, como fator de predição do diabetes tipo I e reflexo de prevalência da patologia em nosso meio, exige o acompanhamento de tais pessoas quanto à possível instalação clínica da doença, assim como para o estabelecimento da sensibilidade e especificidade do teste como marcador do período de pré-diabetes. Recentemente, um estudo objetivando a construção de um modelo para a predição de DMID na população geral, relatou uma sensibilidade/especificidade de 84/96% para os ICAs (HAGOPIAN et al., 1995).

Diferenças interobservador puderam ser contempladas no presente estudo pela repetição dos testes, já que elas diziam respeito apenas a variações nos títulos das amostras positivas e provavelmente foram devidas, pelo menos parcialmente, a interpretações subjetivas de “positividade fraca”. Por outro lado, o PBS e controles negativos e positivos em cada ensaio constituem o parâmetro mais importante para a avaliação de variações interensaio; a constatação de erros e discordâncias em sua

leitura refletem problemas sérios com o teste e invalidariam os demais resultados observados.

Outra modificação experimentada com relação ao teste convencional de detecção dos ICAs, foi a utilização de fixação do tecido, a qual resultou em modificações na sensibilidade e especificidade do ensaio. Lâminas preparadas com o tecido pancreático humano são adequadas para uso somente por um período aproximado de 30 dias. Métodos de fixação, como em solução de Bouin ou em acetona, apresentariam vantagens potenciais sobre o método não-fixado, como o armazenamento por um tempo mais longo e a melhor preservação do detalhe estrutural, além de que os ICAs seriam detectados com igual sensibilidade (DOBERSEN et al., 1979, citados por YAGIHASHI et al., 1982). Entretanto, tal método não foi por nós utilizado porque foi referido que o pâncreas fixado frequentemente mostrava níveis maiores de fluorescência de fundo e um padrão irregular de coloração. Com isto, muitas vezes era observado um nível de concordância de leitura maior com o pâncreas não-fixado do que com o pâncreas fixado.

Ainda, estudos iniciais mostraram que a prevalência dos ICAs em várias épocas depois do diagnóstico do DMID, determinada através do método de fixação com a solução de Bouin, era comparável com os dados obtidos em pâncreas não-fixado. Por razões não definidas, entretanto, menos que 20% dos pâncreas eram considerados substratos satisfatórios para o método fixado, enquanto 80% dos pâncreas do grupo O eram adequados para o método não-fixado (YAGIHASHI et al., 1982). Além disso, ICAs detectados pelo método padrão são invariavelmente da classe IgG (KOBAYASHI et al., 1981) e dados sugeriam que os anticorpos detectados em pâncreas fixado seriam primariamente da classe IgM. Pela possibilidade de que autoanticorpos diferentes estivessem sendo detectados por diferentes métodos, foi feita a recomendação de que se utilizasse tecido fresco não-fixado no *screening* de rotina dos ICAs, ou fosse feita a discriminação do ensaio e método utilizado. Esta medida visava permitir a comparação de resultados de diferentes laboratórios, com um maior número de pâncreas adequados e maior grau de reprodutibilidade, quando da utilização do pâncreas não-

fixado. A recomendação de que pâncreas não-fixado deveria ser utilizado na pesquisa de rotina de ICAs em outros grupos, uma vez que já se mostrava o método apropriado para pacientes com DMID (ROSENBLOOM et al., 1983), reforçou nossa intenção em utilizar pâncreas não-fixado.

Apesar das dificuldades de interpretação dos resultados, onze anos se passaram desde as descrições iniciais dos anticorpos anticélulas da ilhota, até o primeiro “Workshop Internacional” de padronização destes anticorpos. Neste intervalo de tempo, estes marcadores humorais foram sendo, cada vez mais, aplicados à investigação clínica e utilizados para classificar o diabetes, como um fator de risco de futura insulino-dependência em indivíduos predispostos e como um possível correlato da função alterada da célula beta, além de avaliar os efeitos terapêuticos de drogas imunossupressoras.

A maneira escolhida para contornar a variação em sensibilidade de diferentes substratos pancreáticos humanos em laboratórios individuais, foi a confrontação dos tecidos com soros de titulação conhecida, cujo fornecimento é função maior dos próprios “workshops” e dos programas sob os auspícios do “Immunology Diabetes Workshops”. Os relato a seguir procura fornecer outras informações no sentido de justificar a escolha do método convencional de detecção dos ICAs, na execução do presente trabalho.

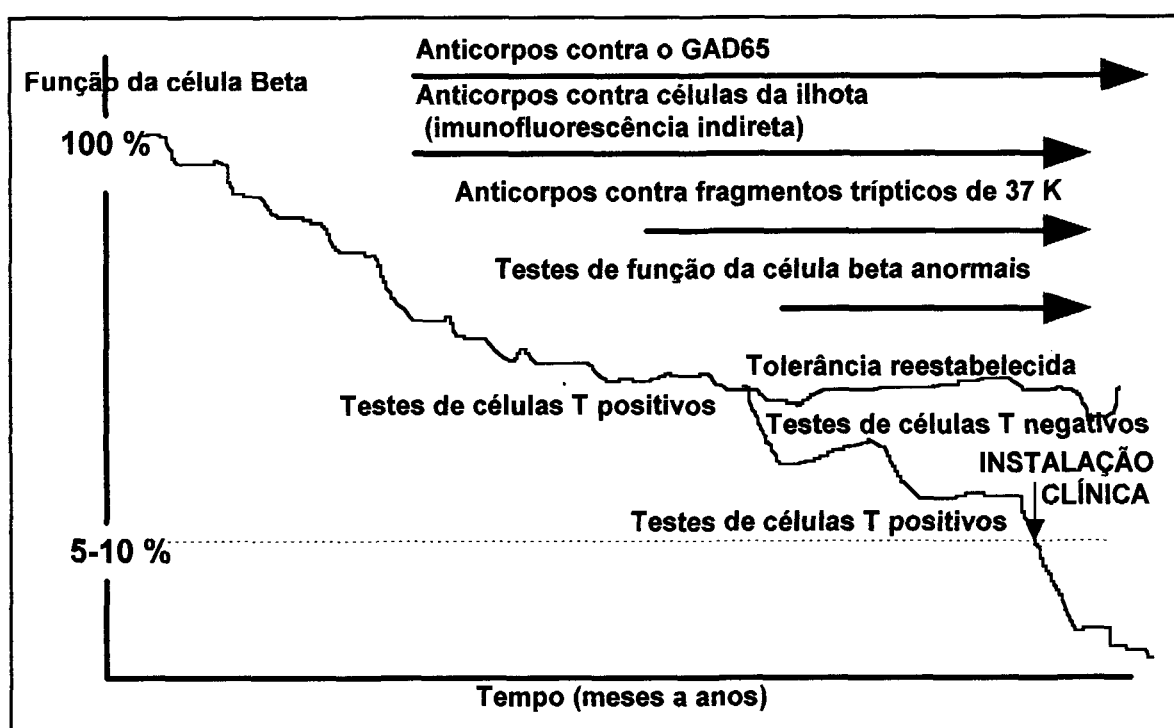
Assim, no Primeiro Workshop Internacional, vinte e seis laboratórios determinaram os valores de ICAs em 13 amostras codificadas de soro (GLEICHMANN e BOTTAZZO, 1987). Vinte e quatro laboratórios realizaram o ensaio de acordo com o protocolo padrão, baseado na técnica convencional de imunofluorescência indireta, em cortes de pâncreas humano pelo criostato. Além disso, 24 laboratórios realizaram uma de oito modificações no ensaio. As amostras eram tituladas até o ponto final e os resultados obtidos eram comparados com aqueles do protocolo padrão. Os dois laboratórios restantes, dentre os 26 participantes, usaram exclusivamente cortes de pâncreas de macaco ao invés de pâncreas humano, ou aplicaram coloração imunohistoquímica. Seguindo o protocolo padrão, a concordância interlaboratório foi

>90%, em 7 das 13 amostras circuladas. Entretanto, uma larga variabilidade de títulos foi registrada, alcançando de negativo a 128. Destas modificações, promoveram uma melhora na sensibilidade a incubação prolongada na presença de aprotinina e a utilização de cortes de pâncreas de macaco. Secções fixadas pela acetona, usadas por seis laboratórios, ou um método de imunofluorescência de duas cores, aplicado por três laboratórios, não mudaram os títulos em 27 de 35 (77%) e 14 de 25 (56%) determinações, com amostras que tinham sido ICA-positivas pelo protocolo padrão. Em contraste, a inativação pelo calor das amostras antes do teste, realizada por cinco laboratórios, resultou em uma diminuição dos títulos em 25 de 39 (64%) determinações. Quatro laboratórios usaram proteína A marcada pela fluoresceína como reagente e observaram uma diminuição nos títulos de ICAs em 22 de 27 (81%) das determinações.

O estágio 3, conduzido em Nova Iorque em outubro de 1987, foi proposto para avaliar a precisão de laboratórios individuais, a especificidade dos ICAs, a melhora da concordância interlaboratório pelo uso do padrão JDF e a expressão dos resultados em unidades arbitrárias comuns (BOITARD, et al., 1988; BONIFACIO et al., 1990; LANDIN-OLSSON, 1990). A análise qualitativa dos resultados obtidos com a amostra de um doador de banco de sangue mostrou uma concordância de 81-89% entre os laboratórios participantes, com relação à ausência dos ICAs. Em 25 de 39 ensaios, todas as 10 amostras ao acaso de doadores do banco de sangue eram ICA-negativo. Diferenças muito grandes nos títulos de ICAs e na sensibilidade analítica entre os laboratórios pode ser observada; entretanto, a conversão dos títulos para unidades, usando a curva de diluição padrão JDF aumentou a concordância entre os laboratórios com maior precisão. A concordância interlaboratório foi, assim, dependente da precisão intra-laboratório. Concluiu-se que os padrões disponíveis permitiram a avaliação da precisão e demonstraram que boa precisão poderia ser alcançada, recomendando-se o uso de soro padrão para futuros trabalhos científicos (LERNMARK et al., 1991). Uma amostra ICA positiva, como a utilizada no presente trabalho, começou a ser utilizada como soro de referência para estabelecer curvas-padrão e expressar ICAs em unidades JDF, arbitrárias, porém comuns a todos os laboratórios.

Dentro dos limites do que vem sendo denominada a hipótese da destruição linear, a época da instalação do diabetes poderá ser passível de previsão com modelos de regressão linear (THAI e EISENBARTH, 1993). Por outro lado, alguns indivíduos poderiam demorar um tempo mais prolongado para atingir o DMID clínico, enquanto outros trilhariam apenas parte do caminho e em termos práticos nunca progrediriam para o DMID (Figura 10) (MEHTA e PALMER, 1996).

FIGURA 11 - OUTRA HISTÓRIA HIPOTÉTICA PARA O DIABETES AUTO-IMUNE



FONTE: MEHTA e PALMER, 1996.

Estudos vêm demonstrando que a associação de vários marcadores poderá melhorar a predição do diabetes tipo I (BINGLEY et al., 1994; HAGOPIAN et al., 1995). Também o reconhecimento dos antígenos envolvidos na reatividade dos ICAs deverá auxiliar na construção de ensaios, eliminando a maior parte dos problemas e dificuldades encontrados atualmente.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Anticorpos antiilhota representam não somente os mais utilizados marcadores da história natural do diabetes tipo I até o momento, como tiveram um papel fundamental na consolidação de conceitos relacionadas a esta doença.

A revisão de alguns aspectos da literatura relacionados a estes anticorpos, no presente trabalho, teve como objetivo esclarecer pontos específicos relacionados à técnica de detecção, bem como estimular o interesse na averiguação da presença de ICAs. A implantação e validação da sua pesquisa por imunofluorescência indireta, com cortes em criostato de pâncreas humano, sem fixação, torna o exame disponível para uso clínico e como linha de pesquisa no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

A aplicação do teste de detecção recém-implantado, em um grupo de pacientes com diabetes tipo I recém-diagnosticado, mostra a prevalência dos ICAs nesta população em nosso meio. Quarenta irmãos de portadores de DMID constituíram um grupo controle especial para o comportamento do ensaio. A porcentagem relativamente alta de positividade neste último grupo serve como estímulo para a ampliação futura da amostra, com acompanhamento para a observação de eventual evolução para diabetes tipo I clínico.

ANEXO 1 - DADOS DOS PACIENTES COM DIABETES TIPO I RECÉM-DIAGNOSTICADO

INICAIS	IDADE	SEXO	LEITURA	CETOACIDOSE
1. RJR	17 anos	M	1:2	Sim
2. RAD	3 anos	M	1:4	Sim
3. CAP	5 anos	M	Negativo	Sim
4. WAJ	18 anos	M	Negativo	Não
5. RM	2 anos	F	1:2	Sim
6. MFS	21 anos	M	Negativo	Sim
7. AN	5 anos	F	Negativo	Sim
8. MU	7 anos	F	Negativo	Sim
9. OR	10 anos	M	1:2	Sim
10. DN	6 anos	F	1:2	Não
11. MN	13 anos	M	1:1	Sim
12. RC	3 anos	M	Negativo	Sim
13. RMRFF	8 anos	M	Negativo	Sim
14. LHP	5 anos	M	Negativo	Sim
15. CK	1 ano	F	1:1	Sim
16. RG	8 anos	M	1:32	Sim
17. TPA	10 anos	M	1:1	Sim
18. RC	13 anos	M	1:2	Sim
19. WMS	8 anos	M	1:64	Sim
20. YLS	1 ano	F	1:16	Sim
21. ELO	19 anos	F	Negativo	Sim
22. RP	9 anos	M	1:4	Sim
23. ETP	6 anos	M	Negativo	Sim
24. ATP	10 anos	M	1:1	Não
25. VC	2 anos	M	1:1	Não
26. LCZ	10 anos	M	1:16	Sim
27. CCO	1 ano	F	1:4	Sim
28. CRO	2 anos	F	1:8	Sim
29. APC	5 anos	F	1:1	Sim
30. LR	10 anos	M	1:16	Sim
31. KKS	7 anos	F	1:32	Não
32. CSC	2 anos	F	Negativo	Sim
33. ALN	20 anos	F	Negativo	Sim
34. ASL	4 anos	F	1:8	Sim
35. GWDS	7 anos	F	Negativo	Sim
36. JTL	23 anos	M	Negativo	Não
37. MMR	11 anos	F	Negativo	Sim
38. ERP	19 anos	F	1:1	Sim
39. ELK	24 anos	M	1:2	Sim
40. ACC	2 anos	F	1:1	Sim
41. LMP	4 anos	F	1:4	Sim
42. DJE	4 meses	F	1:64	Sim
43. FTLIS	12 anos	M	Negativo	Não
44. TGA	10 anos	F	Negativo	Sim
45. BHM	8 anos	F	1:1	Sim
46. VASP	12 anos	F	1:2	Sim
47. JPL	9 anos	F	1:4	Sim
48. CTS	9 anos	F	1:16	Não
49. BLCC	6 anos	F	1:4	Sim
50. IZ	12 anos	F	1:8	Sim

ANEXO 2 - DADOS DOS IRMÃOS DE PORTADORES DE DIABETES TIPO I

INICAIS	IDADE	SEXO	LEITURA
1. EH	10 anos	M	Negativo
2. KLG	6 anos	F	Negativo
3. GTB	3 anos	F	Negativo
4. AFGA	18 anos	F	Negativo
5. WBF	25 anos	F	Negativo
6. WBS	21 anos	F	Negativo
7. MSO	18 anos	F	1:2
8. MMC	3 anos	F	Negativo
9. MSMC	11 anos	F	Negativo
10. FLMC	8 anos	M	Negativo
11. LHAP	4 anos	F	Negativo
12. LCAP	3 anos	F	Negativo
13. MSB	13 anos	M	Negativo
14. JOC	13 anos	M	1:8
15. JOC	10 anos	F	Negativo
16. JLB	9 anos	F	Negativo
17. TLB	5 anos	F	Negativo
18. DBM	17 anos	F	Negativo
19. DCBM	15 anos	F	Negativo
20. LSS	2 anos	M	Negativo
21. JPM	19 anos	F	Negativo
22. GPM	11 anos	F	Negativo
23. GPM	10 anos	M	Negativo
24. GDTB	11 anos	M	Negativo
25. RSO	6 anos	F	Negativo
26. SAJS	15 anos	F	Negativo
27. DLJS	14 anos	M	Negativo
28. TMS	14 anos	F	Negativo
29. AAB	8 anos	F	Negativo
30. AP	15 anos	M	Negativo
31. YS	16 anos	M	Negativo
32. RSS	8 anos	F	Negativo
33. JBO	11 anos	M	Negativo
34. LAG	3 anos	M	Negativo
35. RB	5 anos	M	Negativo
36. MSF	9 anos	M	Negativo
37. CMS	8 anos	M	Negativo
38. EJS	12 anos	M	Negativo
39. MLF	8 anos	M	Negativo
40. WZS	7 anos	M	Negativo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; POBER, JS. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia : W.B.Saunders Company, 1991.
- AL-SAKKAF, L; POZZILLI, P; TARN, AC; SCHWARTZ, G; GALE, EAM; BOTTAZZO, GF. Persistent reduction of CD4/CD8 lymphocyte ratio and cell activation before the onset of type 1 (insulin-dependent) diabetes. **Diabetologia**, v. 32, p. 322-325, 1989.
- ANDREANI, D; DI MARIO, U; POZZILLI, P. Prediction, prevention and early intervention in insulin-dependent diabetes. **Diab Metab Rev**, v. 7, n. 1, p. 61-77, 1991.
- ASSA, S et al. Cytoplasmic islet cell antibodies in type I diabetics in Israel and their first-degree relatives. **Isr J Med Sci**, v. 21, p. 727-730, 1985.
- ATKINSON MA; BOWMAN MA. T-cell markers. In: PALMER, JP [ED.]. **Prediction, Prevention and Genetic Counseling in IDDM**. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 1996.
- BACH, J. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocrine Rev**, v.15, n. 4, p. 516-542, Aug 1994.
- BAEKKESKOV, S; NIELSEN, JH; MARNER, B; BILDE, T; LUDVIGSSON, J; LERNMARK, A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. **Nature**, v. 298, p. 167-169, 1982.
- BAEKKESKOV, S; AANSTOOT, H; CHRISTGAN, S; REETZ, A; SOLIMENA, MS; CASCALHO, M; FOLLI, F; RICHTER-OLSEN, H; DECAMILLI, P. Identification of the 64K autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature**, v. 347, p. 151-56, 1990.
- BENNETT, PH. Changing concepts of the epidemiology of insulin-dependent diabetes. **Diabetes Care**, v. 8 (suppl. 1), p.29-33, Oct 1985.

- BINGLEY, PJ; BONIFACIO, E; SHATTOCK, M; GILMOR, HA; SAWTELL, PA; DUNGER, DB; SCOTT, RDM; BOTTAZZO, GF; GALE, EAM. Can islet cell antibodies predict IDDM in the general population? **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 45-50, Jan 1993.
- BINGLEY, PJ; CHRISTIE, MR; BONIFACIO, E; BONFANTI, R; SHATTOCK, M; FONTE, M-T; BOTTAZZO, G-F; GALE, EAM. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. **Diabetes**, v. 43, p. 1304-1310, Nov 1994.
- BOITARD, C et al. Immunology and diabetes workshop: report on the third international (stage 3) workshop on the standardisation of cytoplasmic islet cell antibodies. **Diabetologia**, v. 31, p. 451-452, 1988.
- BONIFACIO, E; LERNMARK, A; DAWKINS, RL. Serum exchange and use of dilutions have improved precision of measurement of islet cell antibodies. **J Immunol Methods**, v. 106, p. 83-88, 1988.
- BONIFACIO, E; BOITARD, C; GLEICHMANN, H; SHATTOCK, MA; MOLENAAR, JL; BOTTAZZO, GF. Assessment of precision, concordance, specificity, and sensitivity of islet cell antibody measurement in 41 assays. **Diabetologia**, v. 33, p. 731-36, 1990.
- BONIFACIO, E; LAMPASONA, V; GEOVESE, S; BEARZATTO, M; BOSI E. Identification of the IDDM-related 37K as protein tyrosine phosphatase (IA-2/ICA 512). **Diabetologia**, v. 38 [Suppl. 1], p. A5, 1995.
- BONIFACIO, E. Humoral immune markers: islet cell antibodies. In: PALMER, JP [ED.]. **Prediction, Prevention and Genetic Counseling in IDDM**. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 1996.
- BONNER-WEIR, S; SMITH FE. Islet of Langerhans: morphology and its implications. In: KAHN, CR; WEIR, GC. **Joslin's Diabetes Mellitus**. 13. ed.. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994.
- BORSEY, DQ et al. Humoral immunity in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. **J Clin Lab Immunol**, v. 11, p. 9-15, 1983.
- BOSI, E; BECKER, F; BONIFACIO, E; WAGNER, R; COLLINS, P; GALE, EA; BOTTAZZO, GF. Progression to type I diabetes in autoimmune endocrine patients with islet cell antibodies. **Diabetes**, v. 40, p. 977-841, Aug 1991.
- BOTTAZZO, GF; FLORIN-CHRISTENSEN, A; DONIACH, D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. **Lancet**, p. 1279-1283, 30 Nov 1974.

- BOTTAZZO, GF; MANN, JI; THOROGOOD M; BAUM JD; DONIACH D; Autoimmunity in juvenile diabetics and their families. **Br Med J**, v. 2, p. 165-168, Jul 1978.
- BOTTAZZO, GF; DEAN BM; GORSUCH AN; CUDWORTH AG; DONIACH D. Complement-fixing islet-cell antibodies in type I diabetes: possible monitors of active beta-cell damage. **Lancet**, v. 1, p. 668-672, 29 Mar 1980.
- CASTAÑO, L; RUSSO, E; ZHOU, L; LIPES, MA; EISENBARTH, GS. Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase H) associated with type I diabetes. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 73, n. 6, p.1197-1201, 1991.
- DE KRIJGER, RR; VAN KRUGTEN, MV; KRANENBURG, G; AANSTOOT, HJ; MOLENAAR, JL; BRUINING, GJ. Islet cell cytoplasmic antibody reactivity in midgestational human fetal pancreas. **Acta Diabetol**, v. 31, n. 4, p. 232-235, 1994.
- DIB, SA; COLMAN, PG; DOTTA, F; TAUTKUS, M; RABIZADEH, A; EISENBARTH, GS. Expression of cytoplasmic islet cell antigens by rat pancreas. **Diabetes**, v. 36, p. 982-985, Aug 1987.
- EISENBARTH, GS. Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. **N Engl J Med**, v. 314, n. 21, p. 1360-368, 1986.
- EPI-INFO VERSION 5.00. Centers of Disease Controle Epidemiology Program Office, Atlanta, Georgia and World Health Organization, Switzerland, 1990.
- GIANANI, R; EISENBARTH GS. Humoral Autoimmunity. In: PALMER, JP [ED.]. **Prediction, Prevention and Genetic Counseling in IDDM**. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 1996.
- GLEICHMANN, H; BOTTAZZO, GF. Progress toward standardisation of cytoplasmic islet cell-antibody assay: analysis of the data presented at the First International Workshop. **Diabetes**, v. 36, p. 578-584, May 1987.
- GOMES, MB; VIEIRA, LMM; MARQUES, EP; SARNO, EN; CHACRA, AR. Auto-anticorpos para ilhotas de Langerhans: estudo de correlação dos títulos finais dos ICA e positividade aos ICA-CF. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 34, n. 2, p. 14-16, Jun 1990.
- GORSUCH, AN et al. Evidence for a long pre diabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Lancet**, v. 2, p. 1363-365, 1926 Dec 1981.
- GUYTON, AC; HALL, JE. Insulin, glucagon, and diabetes mellitus In: GUYTON, AC; HALL, JE. **Textbook of Medical Physiology**. 9. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996.

- HAGOPIAN, WA; SANJEEVI, CB; KOCKUM, I; LANDIN-OLSSON, M; KARLSEN, AE; SUNDKVIST, G; DAHLQUIST, G; PALMER, J; LERNMARK, A. Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. **J Clin Invest**, v. 95, n. 4, p. 1505-1511, 1995.
- HUTTON, JC. The insulin secretory granule. **Diabetologia**, v. 32, p. 271-281, 1989.
- JOHNSON, GD; ARAÚJO, GMCN. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. **J Immunol Methods**, v. 43, p. 349-350, 1981.
- KOBAYASHI, T et al. Islet-cell antibodies in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetics in Japan: their prevalence and clinical significance. In: INTERNATIONAL CONGRESS SERIES. n. 597. Clinico-Genetic Genesis of Diabetes Mellitus. Proceedings of an International Symposium on Clinico-Genetic Genesis of Diabetes Mellitus, Kobe, Japan, 11-12 Feb 1981.
- KOLB, H et al. Islet cell autoantibodies: which method? **Lancet**, p. 479, 26 Feb 1983.
- LANDIN-OLSSON, M. 1990. Precision of the islet-cell antibody assay depends on the pancreas. **J Clin Lab Anal**, v. 4, p. 289-294, 1990.
- LERNMARK, A et al. A prospective analysis of antibodies reacting with pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetic children. **Diabetologia**, v. 20, p. 471-474, 1981.
- LERNMARK, A et al. The fourth international serum exchange workshop to standardize cytoplasmic islet cell antibodies. **Diabetologia**, v. 34, p. 534-535, 1991.
- LÉVY-MARCCHAL, C et al. Islet cell antibodies in normal French schoolchildren. **Diabetologia**, v. 35, p. 577-582, 1992.
- LEVY-MARCHAL, C; DUBOIS, F; NOEL, M; TICHET, J; CZERNICHOW, P. Immunogenetic determinants and prediction of IDDM in French schoolchildren. **Diabetes**, v. 44, n. 9, p. 1029-1032, Sep 1995.
- MACCUISH, AC et al. Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. **Lancet**, p. 1529-1531, 28 Dec 1974.
- MAHON, JL; DUPRE J. Cyclosporine and azathioprine for IDDM. In: PALMER, JP [ED.]. **Prediction, Prevention and Genetic Counseling in IDDM**. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 1996.
- MARNER, B et al. Reliability of the indirect immunofluorescence test for islet cell antibodies and an evaluation of the effects of plasmapheresis on antibody titres in type 1 (insulin dependent) diabetes. **Diabetologia**, v. 23, p. 185-186, 1982.

- MCEVOY, RC; FRANKLIN, B; GINSBERG-FELLNER. Gestational diabetes mellitus: evidence for autoimmunity against the pancreatic B cells. **Diabetologia**, v. 34, p. 507-510, 1991.
- MEHTA, V; PALMER, JP. In: PALMER, JP [ED.]. **Prediction, Prevention and Genetic Counseling in IDDM**. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 1996.
- MONCAYO, R et al. Islet cell antigens: extraction studies and ELISA analysis. **Diabetes**, v. 37, p. 1137-1143, 1988.
- NERUP, J; MANDRUP-POULSEN, T; HELQVIST, S; ANDERSEN, HU; POCIOT, F; REIMERS, JI; CUARTERO, BG; KARLSEN, AE; BJERRE, U; LORENZEN, T. On the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**, v. 37 (Suppl 2), p. S82-S89, 1994.
- NISKANEN, L; KARJALAINEN, J; SARLUND, H; SIITONEN, O; UUSITUPA, M. Five-year follow-up of islet cell antibodies in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 34, p. 402-408, 1991.
- NOTSU, K. et al. Islet cell antibodies in the japanese population and subjects with type 1 (insulin-dependent) diabetes. **Diabetologia**, v. 28, p. 660-662, 1985.
- OLSSON, ML; SUNDKVIST, G; LERNMARK, A. Prolonged incubation in the two-colour immunofluorescence test increases the prevalence and titres of islet cell antibodies in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 30, p. 327-332, 1987.
- OMAR, MAK; BOTTAZZO, GF; ASMAL, AC. Islet cell antibodies and other autoantibodies in south african blacks and indians with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). **Horm Metabol Res**, v. 18, p. 126-128, 1986.
- PALMER, JP. Predicting IDDM: use of humoral immune markers. **Diabetes Reviews**, v. 1, n. 1, p. 104-115, 1993.
- PIETROPAOLO, M; BABU, S. The target organ: embriology, biochemistry and physiology. In: EISENBARTH, GS; LAFFERTY, KJ.[ED.]. **Type I Diabetes: Molecular, Cellular and Clinical Immunology**. New York: Oxford University Press, 1996.
- PILCHER, C; ELLIOTT, RB. Improved sensitivity of islet cell cytoplasmic antibody assay in diabetics. **Lancet**, v. i, p. 1352, 16 Jun 1984.
- POZZILLI, P; ZUCCARINI, O; JAVICOLI, M; ANDREANI, D; SENSI, M; SPENCER, KM; BOTTAZZO, GF; BEVERLEY, PCL; KYNER, JL; CUDWORTH, AG. Monoclonal antibodies defined abnormalities of T-lymphocytes in type 1 (insulin dependent) diabetes. **Diabetes**, v. 32, p. 91-94, 1983.

PUJOL-BORRELL, R et al. Anticorps anti-cellules des îlots pancréatiques chez des malades atteints d'autres maladies auto-immunes. **Nouv Press Med**, v. 10, n. 34, p. 2791-2793, Sep 1981.

REWERS M.; NORRIS FM. Epidemiology of Type I Diabetes. In: EISENBARTH, GS; LAFFERTY, KJ.[ED.]. **Type I Diabetes: Molecular, Cellular and Clinical Immunology**. New York: Oxford University Press, 1996.

RILEY, W; MACLAREN, N. Islet cell antibodies are seldom transient. **Lancet** v. i, p. 1351, 1984.

RILEY, WJ; MACLAREN, NK; KRISCHER, J; SPILLAR, RP; SILVERSTEIN, JH; SCHATZ, DA; SCHWARTZ, S; MALONE, J; SHAH, S; VADHEIM, C et al. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. **N Engl J Med**, v. 323, p. 1167-1172, 1990.

ROSE, NR; BONA, C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). **Immunol Today**, v. 14, p. 426-430, 1993.

ROSENBLOOM, AL. Autoantibodies to islet cells: comparison of methods. **Lancet**, p. 72-73, 1-8 Jan 1983.

ROSSINI, AA; GREINER, DL; FRIEDMAN, HP; MORDES, JP. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. **Diabetes Reviews**, v. 1, n. 1, p. 43-75, 1993.

SKYLER, JS; MARKS, JB. Immune intervention in type I diabetes mellitus. **Diabetes Reviews**, v. 1, n. 1, p. 15-42, 1993.

SKYLER, JS; MARKS, JB. Future approaches to prevention. In: PALMER, JP [Ed]. **Prediction, Prevention and Genetic Counseling in IDDM**. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 1996.

SRIKANTA, S et al. Islet-cell antibodies and beta-cell function in monozygotic triplets and twins initially discordant for type I diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 308, p. 322-325, Feb 1983.

SRIKANTA, S; RABIZADEH, A; OMAR, MAK; EISENBARTH, GS. Assay for islet cell antibodies : Protein A-monoclonal antibody method. **Diabetes**, v. 34, p. 300-305, Mar 1985.

TAKAHASHI, A; TSUJIHATA, M; YOKOTA, A; YAMAGUCHI, Y; UEDA, Y; AKAZAWA, S; MIYAKE, S; NAGATAKI, S. A new method of detection of islet cell antibodies (ICA) using peroxidase-labeled protein A, and incidence of ICA in type 1 (insulin-dependent) diabetes. **Diabetologia**, v. 29, p. 378-382, 1986.

THAI, A; EISENBARTH, GS. Natural history of IDDM. **Diabetes Reviews**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 1993.

- THIVOLET, C; BEAUFRERE, B; GEBURHER, L; CHATELAIN, P; ORGIAZZI, J; FRANCOIS, R. Autoantibodies and genetic factors associated with the development of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in first degree relatives of diabetic patients. **Diabetologia**, v. 34, p.186-191, 1991.
- VARDI, P; DIBELLA, EE; PASQUARELLO, TJ; SRIKANTA, S. Islet cell autoantibodies: pathobiology and clinical applications. **Diabetes Care**, v. 10, p. 645-656, 1987.
- WILLIAMS, JA; GOLDFINE, ID. The insulin-pancreatic acinar axis. **Diabetes** v. 34, p. 980-986, 1985.
- YAGIHASHI, S; SUZUKI, H; DOBERSEN, MJ; ONODERA, T; NOTKINS, AL; GINSBERG-FELLNER F. Autoantibodies to islet cells: comparison of methods. **Lancet**, p. 1218, 27 Nov 1982.
- ZEIDLER, A; FRASIER, SD; PENNY, R; STEIN, RB; NICOLOFF, JT. Pancreatic islet cell and thyroid antibodies, and islet cell function in diabetic patients of Mexican-American origin. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 54, p. 949-954, 1982.